

UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1972 - N° 593

**ETUDE IN VITRO DES ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES
SUR PSEUDOMONAS AERUGINOSA.**

**INFLUENCE DES VARIATIONS
DE PLUSIEURS FACTEURS EXPERIMENTAUX.**

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon
Section de PHARMACIE
présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Claude-Bernard - Lyon
Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques

le 23 Juin 1972

par

Jacques CHAUMONT

né le 27 Septembre 1943

à BEAUNE (21)

UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD - LYON
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1971 - 72

ETUDE *IN VITRO* DES ASSOCIATIONS SYNERGIQUES
DES PSEUDOMONAS AERUGINOSA

INFLUENCE DES VARIATIONS
DE PLUSIEURS FACTEURS EXPERIMENTAUX

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon

Section de PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

devant l'Université Claude-Bernard - Lyon

Unité d'Enseignement et de Recherche

des Sciences Pharmaceutiques

le 23 Juin 1972

par

Jacques CHAUMONT

né le 27 Septembre 1943

à BEAUNE (21)

UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1972 - N°

**ETUDE IN VITRO DES ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES
SUR PSEUDOMONAS AERUGINOSA.**

**INFLUENCE DES VARIATIONS
DE PLUSIEURS FACTEURS EXPERIMENTAUX.**

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon
Section de PHARMACIE
présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Claude-Bernard - Lyon
Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques

le 23 Juin 1972

par

Jacques CHAUMONT

né le 27 Septembre 1943

à BEAUNE (21)

U N I V E R S I T E C L A U D E B E R N A R D

L Y O N

Président : Monsieur le Professeur J. BOIDIN

1er Vice-Président : M. R. TOURAINE, Maître de Conférences-Agrégé

2ème Vice-Président : M. P. PONCET, Maître-Assistant

3ème Vice-Président : M. D. SETTELEN, Etudiant.

UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

UNITES

DIRECTEURS

U.E.R. médicale Grange-Blanche	M. le Professeur D. GERMAIN
U.E.R. médicale Alexis-Carrel	M. le Professeur C. GIROD
U.E.R. médicale Lyon-Nord	M. le Professeur A. BERTOYE
U.E.R. médicale Lyon-Sud-Ouest	M. le Professeur F. TOLOT
U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques	M. M. CARRAZ, Maître de Conf.-Agrégé
U.E.R. des Techniques de Réadaptation	M. le Professeur P. MOUNIER-KUHN
U.E.R. de Biologie Humaine	M. J.C. CZYBA, Maître de Conf.-Agrégé
U.E.R. d'Education Physique et Sportive	M. A. MILLON, Professeur d'E.P.S.
U.E.R. des Sciences Odontologiques	M. R. VINCENT
U.E.R. de Mathématiques	M. le Doyen J. BRACONNIER
U.E.R. de Physique	M. le Professeur M. DUFAY
U.E.R. de Chimie et Biochimie	M. le Professeur D. GAUTHERON
U.E.R. des Sciences de la Nature	M. le Professeur L. DAVID
U.E.R. de Biodynamique et Psychopédagogie	M. le Professeur R. FONTANGES
U.E.R. de Physique nucléaire	M. le Professeur A. SARAZIN
U.E.R. de Mécanique	M. le Professeur J. MATHIEU
Observatoire	M. le Professeur J. H. BIGAY
Institut Universitaire de Technologie 1	M. le Professeur B. POUYET
Institut Universitaire de Technologie 2	M. J. GALLET

Secrétaire Général : M. P. IZAUTE



A tous les miens

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552611_0038

A notre Président de thèse,
Monsieur le Professeur BADINAND

Sa présence témoigne de l'intérêt qu'il nous a toujours porté, depuis nos premières années de Faculté, durant l'Externat, puis l'Internat, enfin jusqu'à notre thèse qu'il nous fait l'honneur de présider.

Nous le remercions de la bienveillance qu'il nous a accordée au cours de ces études et à l'Hôpital, où nous avons pu apprécier ses qualités humaines et scientifiques. Nous l'assurons de notre respectueux dévouement.

A nos Juges

Monsieur le Professeur MALLEIN

Au cours des trois semestres d'Internat effectués dans son laboratoire, nous avons pu apprécier son érudition dans un grand nombre de disciplines. Il a toujours été pour ses Internes quelque chose de plus que le "Patron" ; qu'il soit assuré de tout notre attachement.

Monsieur le Professeur FLEURETTE

C'est lui qui nous a fourni le sujet de notre thèse ; depuis nos premiers travaux, jusqu'à leurs conclusions, il nous a toujours guidé avec patience et méthode. C'est un peu avec regret qu'est venue la fin de notre travail en commun. Qu'il trouve ici le témoignage de notre reconnaissance.

Monsieur le Professeur CARRAZ

Le fait qu'il ait accepté de faire partie de notre jury est un témoignage d'amitié. Nous avons maintes fois admiré ses brillantes qualités dans les multiples domaines que touche une discipline aussi étendue que la bactériologie. C'est un honneur pour nous qu'il ait bien voulu accepter de cautionner notre travail ; qu'il soit remercié pour la confiance qu'il nous a ainsi témoignée.

Il s'est trouvé que, dans notre Jury, siègent deux chimistes et deux bactériologistes. Les sciences qu'ils représentent et qu'ils enseignent sont celles qui m'ont le plus intéressé, et ce sont celles qui sont naturellement mêlées dans le travail ci-dessous exposé.

A Madame MOULIN

qui nous a accueilli dans son Laboratoire, en fin de cinquième année de Pharmacie. Elle nous y a enseigné la bactériologie "pratique", la façon de manipuler. Son diagnostic extraordinaire nous a toujours émerveillé. Elle a suivi avec attention nos expérimentations. Puisse-t-elle être assurée de notre profonde gratitude.

Aux Internes en Pharmacie qui comptent parmi nos amis.

Nous avons utilisé les abréviations suivantes :

CMI : concentration minima inhibitrice : c'est la plus petite concentration assurant la bactériostase ;

CMB : concentration minima bactéricide : c'est la plus petite concentration assurant la bactéricidie.

Dans toutes nos représentations graphiques, les courbes

- en trait plein représentent la bactériostase,
- en trait discontinu représentent la bactéricidie.

P R E M I E R E P A R T I E

I - I N T R O D U C T I O N

Depuis la découverte du premier antibiotique, la Pénicilline, de nombreux autres antibiotiques ont été proposés aux cliniciens, utilisés, puis abandonnés plus ou moins rapidement. En effet, si les antibiotiques présentent à l'origine un certain "spectre d'activité", on constate que cette activité décroît au cours de l'utilisation de ces antibiotiques. Cette perte d'activité peut être très rapide, obligeant le clinicien à changer d'antibiotique. C'est cet inconvénient majeur qui force les chercheurs à toujours trouver des formules nouvelles.

C'est pourquoi on a préconisé, depuis maintenant une vingtaine d'années, l'emploi d'associations d'antibiotiques : c'est en 1953 que JAWETZ et GUNNISON (69) montrent comment il faut associer deux antibiotiques. Le but de l'opération était, non pas "parce que cela peut aider et ne pas faire de mal" comme on se l'imaginait alors, mais d'élargir le spectre d'action dans le traitement d'une infection sévère d'origine inconnue (81), et surtout d'empêcher, ou du moins de retarder, l'apparition de la résistance d'une espèce microbienne déterminée. De plus, l'association présente l'avantage, dans le cas d'une synergie effectivement contrôlée, de pouvoir prescrire des doses, pour chacun des deux antibiotiques concernés, inférieures à celles qui seraient nécessaires s'ils étaient employés seuls. Cet avantage est particulièrement sensible pour certains antibiotiques lorsque l'on connaît leur toxicité. Un médicament est toujours toxique : les antibiotiques n'échappent pas à cette règle.

L'association d'antibiotiques se justifie sur des germes très résistants, nécessitant très vite, ou même dès le départ, des taux élevés d'antibiotiques pour que l'on puisse observer la bactériostase ou la bactéricidie : c'est notamment le cas des bacilles Gram négatif (40)(41), dont l'un des meilleurs exemples est le Bacille Pyocyane.

Le but de ce travail a donc été d'étudier les conditions dans lesquelles certaines associations d'antibiotiques pouvaient être efficaces sur ce germe redoutable qu'est *Pseudomonas aeruginosa*.

II - PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Le genre *Pseudomonas* appartient à la famille des Pseudomonadacées, elles-mêmes faisant partie de l'ordre des Pseudomonadales.

L'espèce type est *Pseudomonas aeruginosa* : elle a été identifiée par GESSARD en 1882, à partir de suppurations pigmentées en bleu.

LA MORPHOLOGIE :

C'est un bâtonnet étroit de 1 à 2 μ sur 0,5 μ , non sporulé. Il est habituellement non capsulé, mais les souches mucoïdes peuvent cependant l'être. Il est très mobile par son cil polaire, mais seulement en aérobiose. Il est Gram-négatif, et dans son cytoplasme, on peut voir des inclusions. Il peut éventuellement présenter des formes en cocci, en chaînettes, en présence d'antiseptiques, ou quand les cultures sont vieilles.

LES CARACTERES CULTURAUX :

C'est un aérobie strict ; il peut cependant pousser en anaérobiose, transformant les nitrates en ammoniac.

Il est peu exigeant : il pousse sur eau peptonée ordinaire, sur gélose ordinaire, et facilement sur les milieux synthétiques. Cette croissance s'effectue entre 10 et 44° C, avec un optimum à 37°, sur des milieux de pH variant de 6 à 8, avec un optimum à 7,2.

L'aspect des cultures :

1) En bouillon : en eau peptonée ordinaire, en 2-3 heures, on a un trouble homogène, puis on observe un voile en surface, qui s'épaissit, se plisse, et tombe au fond du tube. Le *Pseudomonas* dégage une odeur particulière, liée à la production du pigment. Il existe en fait deux pigments :

la pyocyanine, soluble dans l'eau et dans le chloroforme ; et la pyoverdine, non constamment présente, soluble dans l'eau, et pas dans le chloroforme. Souvent, ce pigment reste inapparent en bouillon ; si on agite le tube, la coloration bleue apparaît.

2) En milieu gélosé : on a décrit cinq types de colonies, dont les plus caractéristiques ont 2-3 mm de diamètre; elles sont peu bombées, leur surface est terne, elles peuvent avoir un reflet métallique ; leurs bords sont un peu dentelés, et elles sont parfois pigmentées ; ce pigment apparaît alors en 24 heures, parfois plus tard, et il diffuse dans toute la gélose.

Il est fréquent d'observer des aspects de lyse, due aux enzymes de la bactérie. En principe, il cultive très bien ; mais quelquefois, il faut utiliser des milieux contenant des antiseptiques : on utilise ainsi le milieu au Cetrimide.

LES CARACTERES METABOLIQUES :

Intense pouvoir protéolytique, à cause des nombreuses protéases qu'il contient : on le constate sur milieu au lait coagulé, sur gélatine; l'albumine d'oeuf, d'abord coagulée, est ensuite liquéfiée. Il a également un pouvoir lipolytique important.

Il est indole négatif, H_2S négatif, uréase positive. Il n'a pas de désaminase du tryptophane, mais il a une arginine-déhydrolase.

Il est oxydase et catalase positives.

Il a un métabolisme oxydatif du glucose.

LA CONSTITUTION ANTIGENIQUE :

Il a un antigène O, qui est l'endotoxine, grâce auquel on a pu déterminer 13 groupes sérologiques (ils ne sont pas rigoureusement spécifiques). Il a également un antigène flagellaire, auquel correspondent de nombreux types.

Enfin, il existe une lysotypie, qui n'est pas totalement spécifique elle aussi.

LA RESISTANCE AUX CONDITIONS PHYSICO-CHIMIQUES :

Le Pyocyanique est résistant aux conditions défavorables ; aux antiseptiques (Vert-Brillant par exemple), au Cetrimide à 0,80 %, au cyanure, à de fortes concentrations de sel. Il a une très forte vitalité ; il est détruit par un chauffage à 60° C pendant 15 minutes ; le formol, le phénol le détruisent, ainsi que les composés mercuriels.

POUVOIR PATHOGENE ;

Le Pyocyanique vit en saprophyte dans l'eau, et en commensal dans l'organisme humain : on le trouve dans les selles, dans l'intestin, sur les muqueuses.

Le pouvoir pathogène EXPERIMENTAL

Chez le lapin, il est pathogène à forte dose : en sous-cutanée, il donne des abcès, puis des septicémies. Par voie intraveineuse, on obtient des abcès sur le rein, le poumon, parfois l'intestin. On provoque facilement des kératites expérimentales, qui entraînent une destruction complète de l'oeil.

Chez la souris, on trouve parfois des septicémies, mais la mort survient le plus souvent par toxémie.

Chez le cobaye, on peut reproduire des péritonites, des vaginites ; la mort survient par toxémie.

Le pouvoir pathogène NATUREL

Le Pyocyanique présente un pouvoir pathogène OPPORTUNISTE chez l'homme ; c'est un germe de SURINFECTION chez les sujets affaiblis.

Autrefois responsable de la "pourriture d'hôpital", il n'est plus désormais responsable d'affections primaires. MOODY (95) ayant étudié 755 souches (à partir de 242 malades et de 13 sources du milieu environnant) a remarqué :

1) que certains types colonisent les malades avec une plus grande fréquence,

2) que les types ont une prédilection pour tel ou tel endroit particulier du corps,

3) que certains types qui colonisent les malades sont aussi décelés à partir d'endroits tout à fait communs de notre entourage, tels que dans des machines à glace, ou plus simplement même dans les éviers !

Le bacille Pyocyannique est donc responsable de deux grands types d'infections :

a) Les infections superficielles : il peut être un agent de surinfection dans de multiples plaies, notamment en période néonatale (83). Mais son rôle pathogène le plus courant est rencontré chez les brûlés (109, 123). Il est aussi la cause d'infections en oto-rhino-laryngologie, et d'infections oculaires ; une porte d'entrée très fréquente est représentée par les trachéotomies.

b) Les infections profondes :

- La septicémie (29), rencontrée à la suite de complications des infections cutanées, ou des cathétérismes pratiqués dans les salles de réanimation,

- la localisation pulmonaire : infections des bronches (67, 104) , endocardites (105),

- la localisation urinaire : de multiples études ont été pratiquées sur ce sujet ; HIRSCHMANN (64) reconnaît que l'association Carbénicilline-Gentamicine, dans de telles affections, représente la meilleure thérapeutique ; SABATH (117) dénonce la responsabilité des manipulations instrumentales dans ces infections.

Il faut mentionner dans ce chapitre le cas très difficile des insuffisants rénaux (138), qui sont très souvent contaminés lors des hémodyalyses ; et surtout des malades ayant subi une greffe : l'infection peut se produire au moment de l'opération, ou (le plus souvent) après, car elle a toutes facilités pour s'installer, le malade étant soumis à des traitements immunosuppresseurs, cortisoniques, lui enlevant toute défense naturelle. Une hygiène rigoureuse devrait être de règle dans ces établissements, d'autant plus rigoureuse que le Pyocyannique possède une capacité de diffusion et de résistance extraordinaires.

- la localisation méningée (90) : elle peut survenir à la suite d'une otite, d'une septicémie, mais le plus souvent elle fait suite à une intervention instrumentale (PL) ou chirurgicale,

- les ostéoarthrites,

- enfin, on trouve souvent le Pyocyannique dans des affections où les défenses naturelles sont très diminuées : hémopathies et cancers (108, 122).

LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

Il est rarement sensible au Chloramphénicol, aux tétracyclines. En général, il est résistant à la plupart des antibiotiques. L'exception est constituée par la Colistine, la Gentamicine et plus récemment la Carbénicilline.

C'est pour retarder cette multirésistance dans toute la mesure du possible que les associations d'antibiotiques sont particulièrement indiquées lorsque l'on se trouve en présence de ces infections. Enfin, elles deviennent non seulement indiquées, mais indispensables, lorsque les antibiotiques usuels s'avèrent impuissants, lors de la détermination de la sensibilité in vitro, à éliminer la souche responsable.

III - INTERET GENERAL DES ASSOCIATIONS

1 - Pourquoi associer des antibiotiques ?

Pour DUVAL (42), il existe plusieurs raisons théoriques pour prescrire une association d'antibiotiques :

1) L'association de deux antibiotiques réduit les chances de sélection de mutants résistants en cours de traitement antibiotique, les mutations simultanées pour deux antibiotiques de groupes différents étant tout à fait improbables.

2) L'élargissement du spectre antibactérien: en fait, cet argument est plus théorique que réel, car aucune association n'est universelle. Néanmoins, on pratique encore ce raisonnement dans des traitements d'urgence pendant le temps nécessaire aux diagnostics bactériologiques, ou lorsqu'il s'agit de traiter une infection mixte. Il faut reconnaître, que, souvent, un résultat équivalent pourrait être obtenu avec un seul antibiotique, à large spectre.

3) La véritable justification réside dans la recherche d'une action plus efficace, en cas d'association estimée synergique, sur une bactérie responsable d'une infection sévère : ce sont les tests in vitro qui permettent de guider le choix de l'association, pour chaque souche, qui est à chaque fois un cas particulier. Dans ce cas, l'association présente en outre l'avantage de diminuer les risques de sélection d'un mutant résistant au cours du traitement.

4) Enfin, l'utilisation d'une association n'apparaissant justifiée qu'en cas de synergie des deux antibiotiques, le troisième but d'une telle pratique est d'abaisser les doses nécessaires à la bactéricidie : c'est là un aspect pratique très important, car TOUS les antibiotiques, à des degrés divers, sont toxiques. L'association peut permettre l'administration de drogues dont les effets secondaires si elles avaient dû être employées seules, auraient interdit l'usage.

2 -Comment évaluer la valeur d'une association ?

On a longtemps cru que les antibiotiques étaient des drogues totalement inoffensives. C'est pourquoi on les a utilisées en association parce que l'on croyait avoir ainsi une plus grande sécurité d'emploi. Pourtant, FINLAND (53) signalait en 1959 des infections sérieuses dues à l'usage inconsidéré des antibiotiques. En fait, on s'est aperçu que ce n'est pas parce que un antibiotique est bon, que deux sont nécessairement meilleurs.

Au contraire, il existe des règles qui autorisent, ou empêchent à priori l'utilisation simultanée de deux antibiotiques : JAWETZ (68) considère que lorsque l'on étudie l'action d'une telle combinaison, sur une population microbienne homogène, l'effet observé peut être de trois types : indifférence, antagonisme, synergie.

L'effet le plus courant est l'indifférence : la combinaison a pour résultat le même que celui donné par le plus actif des deux antibiotiques pris séparément, ou est égal à la somme arithmétique des effets des deux drogues individuellement : le même effet total peut être obtenu avec un seul des deux produits pris à la même dose que dans le mélange. JAWETZ estime que la grande majorité des associations rentre dans cette catégorie.

Le second effet observable est l'antagonisme : cet effet est inférieur à la somme algébrique des effets des deux drogues séparées présentes dans le mélange : on a moins d'effets quand on utilise cette association que lorsqu'on utilise, seul, le plus actif des deux antibiotiques.

Le troisième effet, enfin, est la synergie : c'est celui que l'on espère lorsque l'on décide de mettre en oeuvre l'association. L'effet obtenu est supérieur à la somme algébrique des effets séparés des deux antibiotiques testés séparément. On note que dans une telle combinaison, il se peut que l'un des antibiotiques soit à une concentration nettement inférieure, et donc inefficace, à ce qu'elle est lorsque cet antibiotique est utilisé seul.

Actuellement, on est convenu (42) d'adopter les conventions suivantes, dans le but de juger quantitativement de la valeur d'une association :

- il y a antagonisme lorsque l'inhibition de croissance est obtenue avec des concentrations de chacun des deux antibiotiques supérieures aux CMI (concentrations minima inhibitrices) individuelles ,

- il y a indifférence lorsque chaque antibiotique doit être utilisé à une dose égale à sa CMI (individuelle),

- il y a addition lorsque la CMI de chaque constituant du mélange est abaissée de moitié par rapport à ce qu'elle est quand chacun est pris séparément,

- il y a enfin synergie lorsque les CMI sont abaissées au moins du quart.

Ces définitions sont également valables en CMB (concentrations minima bactéricides), pour lesquelles on parle aussi bien d'antagonisme, d'indifférence, d'addition et de synergie. Lors des tests in vitro faits pour juger du caractère d'une association, on définit, si la méthode choisie le permet, quel est le type d'action en CMI et en CMB : en effet, deux antibiotiques peuvent fort bien présenter par exemple une addition en CMI, mais une synergie en CMB. Ainsi, selon SIMMONS et PATH (120), Colistine et Sulphomethoxazole sont synergiques en bactériostase sur les Pyocyaniques mais seulement indifférents en bactéricidie.

On voit donc que, depuis JAWETZ, on a introduit la notion d'addition; on n'a plus attribué le qualificatif de synergiques qu'à des antibiotiques dont l'action est vraiment très augmentée par la présence d'un autre antibiotique, puisque l'on exige un rapport d'au moins 1 à 4 : on parle d'addition si le rapport n'est que de 1 à 2 .

Toujours selon JAWETZ, l'association de deux bactériostatiques peut être seulement additive ; un bactériostatique et un bactéricide peuvent être antagonistes ; et l'association de deux bactéricides peut être synergique.

Pour MANTEN-WISE (86), il existe des règles permettant de préciser si deux antibiotiques présenteront, ou non, un antagonisme une fois associés : si certains bactériostatiques (Tétracyclines, Chloramphénicol, Erythromycine) ne présentent pas d'antagonisme avec certains bactéricides (Polymyxine, Streptomycine, Néomycine, Bacitracine) , il n'en est pas de même avec d'autres bactéricides (Pénicillines, Vancomycine, Novobiocine), avec lesquels on observe l'antagonisme.

Pour juger des résultats de leurs associations, les auteurs ont effectué des études in vitro (81). Néanmoins, on a constaté généralement le parallélisme entre l'effet observé in vitro en ce qui concerne l'antagonisme (90) et la difficulté d'éradication du germe in vivo. Pour les effets synergiques, il est beaucoup plus difficile de pouvoir juger si cela est vérifiable in vivo (3, 126). RODRIGUEZ (108), étudiant l'association Gentamicine-Carbenicilline, a trouvé qu'elle était toujours valable en thérapeutique ; mais après l'avoir testée vis-à-vis des souches responsables des infections traitées cliniquement, il a conclu qu'il n'y a pas de corrélation entre la sensibilité in vitro et les résultats cliniques. Cependant, pour McCABE (81), les résultats laissent peu de doute : antagonisme et synergie sont tous deux importants cliniquement et correspondent bien aux études in vitro.

Etant donné que deux antibiotiques peuvent être synergiques et donc amener une amélioration dans un traitement, on pourrait être tenté de mettre trois antibiotiques dans un mélange : DOWLING (41) a mis en garde contre un tel usage, car on augmenterait ainsi de façon considérable les risques d'antagonisme.

3 - Intérêt des associations sur les espèces bactériennes

Le point sur l'utilisation des associations a été fait récemment à Paris, au "Colloque sur l'utilisation des associations d'antibiotiques", où les auteurs ont présenté l'état actuel de telles thérapeutiques vis-à-vis des principales bactéries posant des problèmes aux cliniciens, en milieu hospitalier notamment. Outre les appréciations concernant le bien-fondé de l'usage des associations, ces auteurs ont tenté de présenter des explications de leur mode d'action.

LES ASSOCIATIONS UTILISEES

Depuis que JAWETZ-GUNNISON (69) ont énoncé leurs "indications" de probabilité dans des associations, de multiples essais de combinaisons ont été pratiqués, et ce sur un grand nombre de germes.

WOERLE (138) souligne la valeur au laboratoire (vérifiée dans la plupart des cas en clinique) de l'association Pénicilline-Streptomycine

sur les Streptocoques, de Cephalotine-Gentamicine et Pristinamicine-Kanamycine sur le Staphylocoque, de Gentamicine-Céphalotine ou Colimyxine ou Ampicilline sur les Gram -, HERELL (61) montre la synergie Céphalotine-Streptomycine sur Streptocoque viridans. FEKETY-WEISS (52) mesurent la synergie des combinaisons de Streptomycine et Pénicillines ou Céphalosporines sur l'Entérocoque, ainsi que HEWITT (62). OSWALD (100) rapporte une synergie "considérable" de l'Erythromycine et des Pénicillines semi-synthétiques sur le Staphylocoque. SABATH-ABRAHAM (113) signalent une synergie entre Pénicillines et Céphalosporines sur Pseudomonas pyocyanea. PECHERE (102) précise les synergies de l'association Triméthoprime-Sulfaméthoxazole. Il insiste sur le fait que, pour observer une synergie, il faut que les deux constituants entrant dans l'association ne soient pas dans n'importe quelle proportion, mais dans celle de leurs CMI isolées. De LAJUDIE (75) observe que sur la plupart des espèces qu'il a testées les associations Tétracyclines-Macrolides ont une action. BRISOU (16) étudie le "comportement des Serratia d'origine hospitalière en présence de quelques associations d'antibiotiques", et retient que les couples Gentamicine-Carbenicilline, Gentamicine-Acide nalidixique et Acide nalidixique-Colistine apparaissent comme les plus actifs et les plus fidèles. WELSCH (134) rappelle l'activité (non expliquée) pour divers Proteus d'associations Colistine-Sulfamidés. Selon lui, un certain nombre d'exemples de synergies peuvent être expliquées par l'action distincte qu'exerce chacun des antibiotiques associés sur les divers membres d'une population hétérogène : lorsque, exposé au premier antibiotique, le germe donne des mutants hautement résistants, l'adjonction d'un deuxième antibiotique, appartenant à un groupe chimique différent, assure un effet bactéricide en détruisant ces mutants, évitant ou retardant en tout cas leur apparition.

Dans d'autres cas, notamment pour des populations soumises à la Streptomycine, un certain nombre de bactéries, qui sont pourtant sensibles à l'antibiotique, semblent ne pas être atteintes par lui, parce qu'en bactériostase temporaire ; dans ces cas, l'adjonction d'un deuxième antibiotique, capable de tuer les germes au repos, assurerait leur élimination rapide.

La paroi cellulaire intervient dans certains phénomènes de perméabilité, les β lactamines favorisent la pénétration cellulaire d'un antibiotique associé, lui permettant de toucher un organe-cible ou une synthèse protéique par exemple : ce serait peut-être le mécanisme de Pénicilline-Streptomycine.

SABATH (117) rapporte une synergie entre des combinaisons de Pénicillines ou de Céphalosporines sur des Pseudomonas, Klebsiella, Enterobacter, Proteus et Es. coli isolés d'urines. Le phénomène était observé quand la résistance du germe était due à une pénicillinase et quand on utilisait la Méthicilline (ou Cloxacilline), comme substrat compétitif de la β lactamase, puisqu'elle est beaucoup moins hydrolysée. SABATH (112) rappelle que, depuis plus de vingt ans, on s'est aperçu que de petites molécules, sans effet antibactérien par elles-mêmes, pouvaient modifier le comportement de certains antibiotiques. Ces molécules produisent cet effet simplement par changement du pH du milieu : ainsi, la Streptomycine, la Néomycine, la Kanamycine sont plus actives en milieu alcalin ; la Novobiocine, la Chlortétracycline en milieu acide. Enfin, il existe des produits, tel le Probénécide (avec les Pénicillines et les Céphalosporines) dont l'effet ne peut être démontré qu'in vivo, car leur action consiste seulement à maintenir un taux élevé d'antibiotiques dans le sérum.

4 - L'intérêt des associations sur PSEUDOMONAS AERUGINOSA

De très nombreuses études ont été effectuées à ce sujet :

- SIMMONS (120) signale une synergie entre la Colistine et les Sulfamides sur Pseudomonas aeruginosa, ainsi qu'entre Gentamicine et Sulphamethoxazole.

- ZECH (139) a utilisé l'association Ampicilline-Colistine sur trente et une souches.

- BROWN (19) la Polymyxine et le Polysorbate 80,

- FRAHER (55) des Pénicillines β lactamase-résistantes et des Pénicillines β lactamase-sensibles,

- DUVAL (43) les associations entre Colistine, Gentamicine, Carbénicilline, Rifampicine, Streptomycine,

- ACAR (1) les associations de β lactamines,

- CLUZEL (30) a associé un grand nombre d'antibiotiques sur des Entérobactéries et des Pseudomonadacées ; d'où il ressort certaines associations favorables : Chloramphénicol-Polymyxine, Auréomycine-Polymyxine ; par contre, Néomycine-Chloramphénicol, Framycétine-Terramycine ou Colistine sont fréquemment antagonistes.

- EICKHOFF (47) utilise Polymyxine B et Colistine ,

- ANDRIOLE (3) Carbénicilline et Gentamicine, etc...

Nous allons donc nous attacher maintenant plus particulièrement au cas des associations entre les trois antibiotiques dont l'action est généralement connue.

Intérêt des associations entre Colistine, Gentamicine, Carbenicilline

a) L'association Colistine-Gentamicine

Cette combinaison est classiquement employée en clinique:

- DUVAL (43) rapporte une étude portant sur cinq souches, avec un résultat indifférent ou au plus additif, tant en bactériostase qu'en bactéricidie.

- BULGER-KIRBY (22) signalent une addition, ce qu'ils appellent une "synergie partielle", pour quatre souches sur treize testées, et ce en bactéricidie ; pour les neuf autres, l'association était indifférente pour quatre, et intermédiaire entre l'indifférence et l'addition pour les autres. Ils n'ont pas relevé d'antagonisme.

- Par contre, MOUTON-HOLTRIGTER (96) signalent que Gentamicine et Colistine sont antagonistes vis-à-vis du Pyocyanique, l'association étant testée par la technique des bandes imprégnées d'antibiotiques.

b) L'association Colistine-Carbénicilline

BRUMFITT (21) rapporte une synergie sur trois souches, en bactériostase et en bactéricidie.

DUVAL (42) a également testé cette association sur cinq souches de Pyocyaniques et a constaté une indifférence en bactériostase, mais une synergie en bactéricidie pour trois des cinq souches (il remarque qu'il n'y a pas d'antagonisme dans cette association). Par contre CONDON-DALTON (32) insiste, lui, sur un antagonisme très net en bactériostase entre ces deux antibiotiques. Il est vrai qu'il utilise un inoculum très important, et c'est peut-être la cause du manque de sensibilité à la Carbénicilline. Il a travaillé sur trente souches.

EICKHOFF (46) a observé un antagonisme pour six souches sur vingt sept testées.

MOUTON (96) préconise la prudence dans l'emploi de cette association, car il trouve lui aussi que ces deux antibiotiques sont antagonistes.

c) L'association Carbénicilline-Gentamicine

Celle-ci, au contraire, a été très largement étudiée, tant in vitro qu'in vivo.

A une exception près, les auteurs s'accordent pour lui reconnaître au moins les qualités de l'addition, quand ce ne sont pas celles de la synergie.

PHAIR (103) reconnaît la synergie pour quinze des seize souches qu'il a étudiées.

RODRIGUEZ (108) étudiant l'association sur trente deux infections chez des cancéreux, dont cinq à Pyocyaniques, relève une bonne synergie, notamment pour les cinq Pyocyaniques, et signale que l'administration intraveineuse des deux produits a été bien tolérée, avec le minimum de toxicité. Les Pyocyaniques étaient responsables de septicémies dans des leucémies aigues.

SMITH (122) traite dix malades avec l'association : il considère que cinq de ces malades ont été débarrassés de leur Pyocyanique.

BRUMFITT (21) rapporte que la combinaison Carbénicilline-Gentamicine est plus efficace que n'importe quelle drogue seule sur *Pseudomonas aeruginosa*.

MOUTON trouve des résultats plus décevants (96) : l'addition est fréquemment observée, mais la synergie ne l'est que de façon sporadique ; il a recommencé ses expériences avec des inoculums particulièrement lourds, ceux-ci n'ont pas modifié les résultats.

SONNE-JAWETZ (124) testent dix souches de Pyocyaniques et admettent la possibilité d'une "amélioration" dans la sensibilité de huit de ces dix souches quand elles sont traitées par l'association.

KLASTERSKY (72) reconnaît que plusieurs souches testées in vitro avec l'association montrent une synergie pour celle-ci, mais que les essais cliniques sont beaucoup plus limités ; il guérit néanmoins neuf de ses seize malades infectés par du Pyocyanique.

ANDRIOLE (3) n'observe une synergie que pour seize des cinquante souches qu'il a testées, et se pose la question de savoir si

l'effet observé in vitro peut avoir une quelconque application clinique, car ses études in vivo sur le rat laissent des résultats difficiles à interpréter.

HIRSCHMANN (64) conclut que, pour beaucoup de cliniciens, la meilleure thérapeutique pour les infections à *Pseudomonas* reste cette association.

DUVAL (42), enfin, sur ses cinq souches, trouve une synergie dans trois cas en bactériostase, et pour les cinq en bactéricidie.

La note discordante vient de McLAUGHLIN-REEVES (85) qui assurent que l'activité antibactérienne de la Gentamicine a été entravée par la Carbénicilline : chez des malades, chez des animaux de laboratoire, et dans des tests in vitro. Ils concluent que le traitement par ces deux médicaments simultanément peut, dans certaines circonstances, être moins efficace que s'il était conduit avec la Gentamicine seule ou la Carbénicilline seule. Selon eux, des doses élevées de Carbénicilline peuvent inactiver la Gentamicine donnée simultanément par voie veineuse. Il semble donc inutile d'augmenter les doses de Gentamicine pour améliorer les taux sériques de cet antibiotique, quand des doses très élevées de Carbénicilline sont données en même temps. Dans ce cas, et si la Gentamicine inactivée ne se révélait pas oto-toxique, la Carbénicilline pourrait être un antidote pour la Gentamicine accidentellement surdosée.

WINTRES (137) a vérifié que de hautes concentrations en Carbénicilline peuvent diminuer l'activité antibactérienne de la Gentamicine in vitro si on les mélange quelques heures avant l'expérience. Or McLAUGHLIN, dans ses observations in vivo, avait préparé son mélange 24 heures avant l'administration au malade, ce qui explique peut-être l'inactivité constatée.

Dans l'étude que nous avons effectuée, nous nous sommes donc proposés d'étudier le comportement d'une souche de sensibilités moyennes aux trois antibiotiques choisis ; nous avons effectué les trois associations, en faisant varier un certain nombre de paramètres qui, pensions-nous, pouvaient influencer sur les résultats de ces associations.

IV - LA DETERMINATION PRATIQUE DE LA VALEUR D'UNE ASSOCIATION

SUR UN GERME DONNE

Si certains auteurs ont préconisé d'emblée des associations, vu le caractère de l'urgence de certains cas (RODRIGUEZ, 108), McCABE (81) insiste sur le fait que les variations particulières dans la sensibilité des microorganismes aux mélanges d'antibiotiques sont si grandes qu'il est extrêmement difficile de prédire, sans tests soigneux in vitro, s'il y aura synergie ou antagonisme lors de l'utilisation de telle ou telle association.

Car une chimiothérapie par association d'antibiotiques faite sans raison valable peut avoir des conséquences indésirables (WELSCH, 134): augmentation des cas d'allergie médicamenteuse, soumission inutile du malade à la toxicité primaire du médicament, négligence de la recherche du diagnostic étiologique, et surtout sélection de germes résistants à deux antibiotiques et non à un seul parmi les nombreuses espèces potentiellement pathogènes.

Seul le résultat du laboratoire devrait permettre de confirmer que l'association envisagée est au moins additive, de façon à éviter au malade de supporter une association là où un antibiotique aurait agi aussi bien seul.

A - Les tests in vivo

On a étudié sur différents animaux l'effet d'associations d'antibiotiques. Ces études, plus difficiles que celles effectuées in vitro, apportent des renseignements supplémentaires.

Ainsi JONES-LOWBURY (70) ont essayé la Carbénicilline et la Gentamicine sur la souris ; ils faisaient à cet animal des brûlures sur 5 % du corps, et inoculaient dessus $700 \cdot 10^6$ de bacilles Pyocyaniques. Ils étudiaient notamment l'action de l'antibiotique mis tout de suite après la brûlure, et avant l'inoculum, 24 heures après l'inoculum, 48 et 72 heures après. Ils ont également fait ces expériences en mélangeant un Staphylocoque avec le Pyocyanique, pour voir si la présence d'un germe produisant une pénicillinase intervient sur la protection par la Carbénicilline contre le Pyocyanique : ils ont ainsi constaté que ces staphylocoques détruisaient l'activité de celle-ci ; que les souris traitées par l'antibiotique avant l'inoculum étaient protégées par lui, ceci étant vrai pour la Carbénicilline, mais pas toujours pour la Gentamicine, et jamais pour la Colistine ; que lorsque le traitement avait lieu 24 heures après l'inoculation, il était comparable à ce qu'il était avant ; par contre, il était nettement moins bon quand il était fait après 48 et 72 heures. Les auteurs expliquaient que l'inactivité de la Colistine serait due à ce que l'on ne la retrouvait pas dans le sérum des souris, quoiqu'il y en ait eu à la nécropsie dans les reins.

ANDRIOLE (3) a fait des travaux sur le rat pour prouver la synergie de Carbénicilline et Gentamicine sur *Pseudomonas aeruginosa* ; lui aussi a administré les antibiotiques après l'inoculum, à des temps de 2,8 et 24 heures.

Des études ont été faites en clinique. STEPHENSON (126) cite un cas où l'utilisation de l'association Colistine-Carbénicilline s'est révélée synergique in vivo, alors que cette synergie n'était pas du tout évidente par tous les tests in vitro. RODRIGUEZ (108), SILVERBLATT (119), HOLMES (67), ZECH (139), ACAR (1), SMITH (122), KLASTERSKY (72) rapportent des cas d'utilisation clinique d'association. Si ces études apportent des renseignements inestimables, elles ne devraient cependant pas être entreprises sans les résultats de celles entreprises in vitro.

B - Les tests in vitro

1 - Choix des antibiotiques à tester

Pour effectuer les tests, la première détermination consiste à choisir les antibiotiques susceptibles d'entrer dans l'association. On devra donc pratiquer l'antibiogramme de la souche contre laquelle on veut agir.

2 - Les techniques

a) La technique par dilutions en carré en milieu liquide

Chaque antibiotique, à partir d'une concentration de départ, est dilué de 2 en 2, par passages successifs. Et chaque dilution du premier antibiotique est associée ainsi à toutes les dilutions du second, et réciproquement. Cette technique, de loin la plus utilisée, est aussi celle qui demande le plus de manipulations.

On évalue, généralement après 18 heures, ou 24 heures, les CMI : tous les tubes qui ne présentent pas de culture visible sont repiqués sur milieu solide de façon à pouvoir déterminer, 24 heures plus tard, la CMB.

b) La technique de microtitrage

Cette technique dérive de la précédente (3, 63, 72, 88, 91) : elle utilise un appareil faisant automatiquement les dilutions des antibiotiques et ce en microméthode. L'avantage est que cette technique, très rapide, supprime les manipulations fastidieuses nécessitées par les dilutions en carré, et on opère sur des quantités beaucoup plus faibles. HERWICK (63) qui reconnaît ces qualités, précise que le microtitrage donne 94 % de résultats en accord avec les dilutions en tube en ce qui concerne les CMI. Cependant, pour certains antibiotiques, le microtitrage ferait apparaître une moins bonne activité qu'en tubes.

c) L'imprégnation de disques

Les antibiotiques sont distribués indépendamment sur des disques stériles (67, 120) : en mettant plusieurs disques, ou des fragments de disques, dans une succession de tubes, on arrive à faire une gamme décroissante de concentrations ; par exemple, pour un antibiotique A, dont la charge est de 20 µg par disque, si on met dans quatre tubes successifs 4, 3, 2, 1 et 1/2 disques, on a finalement les concentrations de 80, 60, 40, 20 et 10 µg d'antibiotique A ; on peut faire la même opération avec l'antibiotique B, et combiner les deux. Cela revient à la dilution en carré, mais c'est le mode de répartition de A et B qui diffère.

Néanmoins, cette méthode est peu précise, et on observe régulièrement un manque de corrélation dans les résultats avec ceux obtenus par la

méthode des dilutions en carré ; c'est ce que remarque PHAIR (103) à propos de mesures de la sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* à la combinaison Gentamicine-Carbénicilline.

d) La technique de diffusion en milieu gélosé

C'est la technique de PATTE (101) : la méthode consiste à étaler sur un milieu solide des bandes de papier imprégnées d'antibiotiques : les deux bandes, l'une imprégnée de A, l'autre de B, sont placées perpendiculairement l'une à l'autre ; les antibiotiques diffusent dans la gélose perpendiculairement à la bande qui les émet : la lecture s'effectue 24 heures après l'ensemencement du germe par inondation. La forme de la courbe d'inhibition de pousse (angle saillant, rentrant ou droit) permet de dire quelle est l'action. La technique des transferts sur cellophane de CHABBERT (25) permet de déterminer ensuite la bactéricidie (30, 95).

c) La technique des dilutions en milieu gélosé

Les antibiotiques peuvent être incorporés à la gélose, sur laquelle on peut alors déposer un grand nombre de souches ; cette méthode, si elle permet l'étude de la sensibilité de nombreuses souches à une association, permet difficilement de voir comment évolue cette association quand on fait varier les concentrations respectives des antibiotiques (contrairement à la méthode des dilutions en carré, qui oppose toutes les concentrations possibles, mais ne permet, au cours d'une même expérience, que de tester une seule souche). Enfin, le dernier inconvénient est qu'on ne lit ainsi que la bactériostase, et pas la bactéricidie.

f) Comparaison des méthodes

P. de LAJUDIE (75) dans sa détermination des courbes d'essai bactériostatique des associations d'antibiotiques (Tétracyclines-Macrolides) a utilisé différentes méthodes respirométriques ; étude des courbes de croissance, diffusion en milieu gélosé, dilutions en milieu gélosé, dilutions en milieu liquide en carré. Il conclut de ses expériences que c'est cette dernière qui est incontestablement la plus précise et la plus fidèle.

3 - Importance de certains paramètres du milieu d'étude in vitro

a) Les milieux utilisés

Le milieu de culture présente une importance capitale, notamment lorsque l'on utilise une technique en milieu liquide. DECOURCY (37) a déterminé l'effet de la composition nutritionnelle de divers milieux sur le développement de la résistance à la Polymyxine B de *Pseudomonas aeruginosa* : il a montré que cette composition joue sur la résistance, mais aussi sur le temps nécessaire à l'apparition des souches résistantes.

Récemment CALHOUN (24) a signalé que le fait de cultiver *Pseudomonas aeruginosa* en présence de fructose comme seule source de carbone le rend sensible à des inhibiteurs de croissance analogues de phényl-alanine et de tyrosine.

Si de nombreux auteurs ont utilisé le milieu trypticase-soja (52, 62, 100, 119), celui-ci peut présenter l'inconvénient de modifier le comportement de certains germes : FEKETY (52) a noté l'inactivation de la Céphalotine, testée sur ce milieu vis-à-vis d'entérocoques.

On emploie souvent le bouillon Brain-Heart (62, 49, 117) et maintenant le milieu Mueller-Hinton (51).

b) L'importance du pH

Dans tous les cas, il faut souligner l'importance de ce paramètre, SABATH (116) signale que le Pyocyanique est plus sensible à la Novobiocine en milieu acide.

BODEY (13) montre que la Carbenicilline est inactive en milieu acide ; la Gentamicine est plus active en milieu alcalin.

c) Les ions calcium et magnésium

Il apparaît donc que la composition du milieu sur lequel on détermine la sensibilité d'un germe devrait être rigoureusement contrôlée : c'est particulièrement vrai pour les ions.

GILBERT (57) étudiant l'effet des concentrations de calcium et de magnésium sur la sensibilité in vitro de *Pseudomonas aeruginosa* à la Gentamicine, a constaté que ces concentrations, qui diffèrent beaucoup entre les divers milieux et parmi les lots d'un même milieu, affectent de façon significative cette sensibilité ; ainsi, sur Mueller-Hinton, quand la concentration en magnésium passe de 30 à 45 mg/l, la moyenne des CMI passe de 1,8 à 5,6 µg/ml, quand la teneur en calcium passe de 12 à 105 mg/l les CMI passent de 0,57 à 2,1 µg/ml : ces chiffres montrent le besoin de standardiser les concentrations en Ca et Mg des milieux si les résultats valables et reproductibles veulent être obtenus. L'auteur estime raisonnable de suggérer l'établissement d'un milieu de référence pour déterminer la sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa*, à la Gentamicine notamment. Il conseille l'emploi du Mueller-Hinton liquide à cause de ses concentrations en Ca et Mg qui sont "familières, basses et cataloguées".

Dans un même ordre d'idées, DAVIS (34) confirme que le calcium inhibe l'action de la Polymyxine sur *Pseudomonas aeruginosa* ; l'activité bactéricide in vitro de la Colistine serait complètement inhibée par des concentrations physiologiques en calcium, cela vis-à-vis du Pyocyanique ; et c'est bien le calcium qui est responsable de cette inactivation, car *Escherichia Coli*, dans les mêmes expériences, est immédiatement détruit.

BROWN (17, 18) a également étudié le rôle des cations bivalents sur l'action de la Polymyxine B et de l'EDTA sur *Pseudomonas aeruginosa* et est parvenu aux mêmes conclusions.

d) Le chlorure de sodium

C'est un des paramètres du milieu qui est facilement accessible. DENIS (39) rapporte l'influence du NaCl sur l'activité antibactérienne de la Gentamicine ; pour lui, l'accroissement de son taux s'accompagne d'une augmentation très importante de la CMI de la Gentamicine pour le Pyocyanique. Cette apparition de résistance élevée s'expliquerait par une absence de fixation ou de pénétration de l'antibiotique sous l'influence du NaCl, cette modification étant imputable soit au sel par lui-même, soit aux nouvelles conditions osmotiques créées par sa présence.

De même, MEDEIROS (91) qui avait noté que ses souches de Pyocyaniques étaient beaucoup plus sensibles à la Gentamicine en milieu

nutritif qu'en Mueller-Hinton, a remarqué que si l'on ajoutait du NaCl à ce milieu nutritif, on augmentait les CMI sur ce nouveau milieu, jusqu'à atteindre les CMI des autres milieux.

L'importance de ces paramètres est valable aussi bien pour les milieux solides que pour les milieux liquides. ROLINSON (110) a précisé que les souches sont plus résistantes à la Carbénicilline quand elles sont testées sur milieu liquide que lorsqu'elles le sont sur agar.

Il reste l'influence d'un dernier milieu d'étude in vitro qui lui n'est pas synthétique. Il s'agit du sérum.

e) Le sérum

FEKETY-WEISS (52) avaient remarqué que lorsqu'ils traitaient une affection à entérocoques avec la combinaison Streptomycine-Pénicilline ou Cephalosporine in vivo, le sérum accentuait l'inconvénient observé in vitro sur trypticase-soja, c'est-à-dire l'inactivation des Céphalosporines.

FISCHER (54) a décrit une méthode pour la détermination du pouvoir antibactérien du sérum pendant le traitement d'affections aiguës : il prenait le sang des malades traités par un (ou par une association) antibiotique et testait sur ce sang la bactérie responsable. Il utilisait pour ce faire la méthode des dilutions en tubes.

McLAUGHLIN-REEVES (85) ont étudié l'inactivation de la Gentamicine par la Carbénicilline sur des pools de sérums humains.

DAVIS (34) décrit une synergie et un antagonisme paradoxal entre sérum et Colistine : Polymyxine B ou Colistine sont synergiques avec le sérum sur *Esc. coli* mais Colistine et sérum sont antagonistes sur *Pseudomonas aeruginosa*. L'étude a été faite par dilution en tubes, les sérums étant conservés à -65° . La conclusion de l'auteur est que la Colistine n'est pas active in vivo sur le *Pyocyanique*. Le facteur inhibiteur est en fait le calcium, puisque la Colistine redevient active sur ce germe en présence d'EDTA.

L'utilisation du sérum au lieu des milieux ordinaires peut donc être intéressante puisqu'elle permet de se rapprocher des conditions rencontrées in vivo. Malheureusement, si on a montré les difficultés rencontrées dans une standardisation des milieux courants, nécessaire pour

espérer des résultats reproductibles, on imagine celles qu'il faudrait surmonter pour avoir un sérum de qualité égale au cours d'expériences successives.

f) L'inoculum

C'est un autre facteur très important de l'étude in vitro, surtout en ce qui concerne le Pyocyanique. Deux chapitres sont à envisager sur ce sujet.

1) La numération : à propos d'études sur *Pseudomonas aeruginosa*, les auteurs ont employé des inoculums dont la richesse était très variable.

- SIMMONS-PATH (120), étudiant une potentialisation de la Colistine par le Sulphamethoxazole et le Sulphaméthizole lors d'essais sur vingt souches de Pyocyaniques, par la méthode des dilutions en tube, ont utilisé 0,02 ml d'une dilution au 1/10 000^e de la culture d'une nuit, ce qui correspondait à environ 5 à 10 000 germes/ml. Ils ont ainsi trouvé, avec cet inoculum "léger", une amélioration en CMI et en CMB de l'action de la Colistine sur dix neuf des vingt souches ; ils ont également rapporté que l'association Suphamethoxazole-Gentamicine était synergique en bactériostase, mais indifférente en bactéricidie ; et que Carbénicilline-Sulphamethoxazole se révélait être une association indifférente tant en CMI qu'en CMB

- MEDEIROS (91) recherchant l'effet de la concentration en sel du milieu d'étude in vitro sur l'activité de la Gentamicine vis-à-vis du Pyocyanique emploie un inoculum d'environ 50 000 bactéries, obtenu à partir d'une dilution au 1/100^e d'une culture d'une nuit. Il opère par dilutions en tube, sur milieu de Mueller-Hinton, et sur Trypticase-soja. Il constate une augmentation des CMI, par la présence de chlorure de magnésium ; il ne détermine pas les CMB, comme c'est le cas de nombreux auteurs.

- FEKETY (51) qui travaille sur Mueller-Hinton par la technique du microtitrage, mesure la sensibilité de trente huit souches à la Carbénicilline : son inoculum varie entre 1 et $2 \cdot 10^5$ germes/ml, et il rapporte que les CMI sont directement proportionnelles à l'inoculum ; ainsi, avec 10^5 germes/ml, la CMI moyenne est à 70 µg/ml ; avec 10^8 /ml, elle est à 200 µg/ml.

- WILLIAMS (136), mesurant les CMI et CMB de cent treize souches pour la Carbénicilline avec la technique des dilutions en Mueller-Hinton, utilise pour inoculum 0,1 ml d'un milieu contenant 10^7 germes/ml, eux-mêmes obtenus par culture de 18 heures sur Mueller-Hinton. Il trouve que 80 % des souches ont des CMI comprises entre 50 et 200 $\mu\text{g/ml}$, mais que seulement 55 % ont des CMB inférieures à 500 μg .

- BELL-SMITH (7) étudiant l'action de la Carbénicilline sur huit souches, par la méthode des dilutions en milieu gélosé, utilisent un inoculum de 10^6 germes/ml, qu'ils ajustent par photométrie, ce qui est discutable, car on compte ainsi les cadavres de bactéries éventuellement présentes dans le trouble mesuré. Cet inoculum est lui aussi préparé à partir d'une culture d'une nuit ; ils trouvent six souches dont les CMI sont entre 25 et 200 $\mu\text{g/ml}$, une en-dessous de 25, l'autre au-dessus de 200.

- HOLMES (57), recherchant l'apparition de la résistance chez les *Pseudomonas* au cours de la thérapeutique par la Carbénicilline, remarque l'importance de la quantité des Pyocyaniques utilisés lors de l'étude in vitro : il opère par dilutions en tube ; quand l'inoculum est de 10^5 /ml, 25 $\mu\text{g/ml}$ d'antibiotique inhibent 30 % des souches ; quand il est de 10^7 /ml, 25 $\mu\text{g/ml}$ en inhibent moins de 5 % , et 100 μg seulement 29 % . Mais 10^7 germes représentent déjà un inoculum très lourd.

- DECOURCY (36), qui a étudié la prévention de l'apparition de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* à la Polymyxine B par la Coumadine, et qui travaillait sur Trypticase-soja pour la détermination des CMI, puis sur gélose-agar pour celle des CMB, employait pour inoculum 0,1 ml d'une suspension, ajustée au photomètre, contenant de $1,5$ à $3 \cdot 10^8$ germes/ml, eux-mêmes obtenus après culture d'une nuit. Il a ainsi trouvé que 25 $\mu\text{g/ml}$ de Polymyxine n'empêchaient pas l'apparition des germes 72 heures après le début de l'expérience ; mais que 0,8 μg de Polymyxine + 6,3 μg de Coumadine stérilisaient le milieu, puisqu'aucune culture n'était encore apparue après 288 heures.

- Enfin, HOFFMANN (65), dans la première phase de son étude sur la sensibilité de trente sept souches à la Carbénicilline, employait une autre méthode : il prenait une colonie sur milieu solide, et la mettait en suspension dans 1 ml de milieu BBL : il répartissait ensuite ce bouillon sur une boîte de gélose où était incorporée une concentration

d'antibiotique, variant de 12,5 à 200 $\mu\text{g/ml}$; chaque boîte était ainsi inondée avec 10^8 à 10^9 bactéries. Après ce dégrossissage, il utilisait une technique en milieu liquide, par microtitrage, mais cette fois avec un inoculum "classique" de 10^5 à 10^6 germes/ml, après culture d'une nuit. Il a trouvé de cette façon des CMI, pour vingt et une souches sur trente sept, inférieures à 100 $\mu\text{g/ml}$.

Pour évaluer cet inoculum, une technique simple consiste à répandre 0,1 ml de l'inoculum sur une boîte de gélose ; on fait auparavant les dilutions nécessaires, de façon à ce que les colonies soient comptables après 24 heures. Ainsi, pour une culture que l'on estime être entre 10^5 et 10^6 germes/ml, on fait une dilution au 1/1000° ; si on étale 0,1 ml, on lira le lendemain entre 10 et 100 colonies.

On peut également utiliser une gélose pour compte de germes et y incorporer 1 ml de la dilution.

2) L'âge de l'inoculum : la grande majorité des expériences ont été faites avec des inoculums de 18 heures ; c'est ce qu'ont rapporté tous les auteurs que nous venons de citer.

- PHAIR (103), évaluant la sensibilité in vitro de *Pseudomonas aeruginosa* à la Carbénicilline, et à la combinaison Carbénicilline-Gentamicine, a utilisé pour inoculum 0,1 ml d'une dilution 1/100° d'une culture d'une nuit et a remarqué que le Pyocyanique ne montre pas de différence de sensibilité à la Carbénicilline et à la Gentamicine s'il est âgé de 18 heures ou de 36 heures (dans les deux cas, on a atteint la phase stationnaire de croissance, on est en présence de bactéries dites "au repos").

- DUVAL (42), qui a testé l'action de plusieurs associations pour cinq souches, et qui opérait par la méthode des dilutions en carré et en milieu liquide, employait pour inoculum 500 000 germes obtenus à partir d'une culture de 24 heures.

- Mais, pour ROLINSON (110), qui a étudié et rapporté la bactériologie de la Carbénicilline, il faut utiliser des inoculums JEUNES, de 2 ou 3 heures, où les bactéries sont en pleine croissance, dans la phase exponentielle.

On voit donc que des inoculums très variables ont été utilisés, tant du point de vue qualitatif (puisque âgés de 2 à 24 heures), que du point de vue quantitatif (puisque variant de 10^4 à 10^8 germes/ml).

g) La température d'incubation

Elle a toujours été fixée à 37°C.

h) L'administration des antibiotiques

Les antibiotiques sont distribués l'un après l'autre dans tous les tubes, puis on rajoute l'inoculum.

MOELLERING-WEINBERG (93) ont, en décembre 1971, parlé d'un décalage dans l'administration d'antibiotiques lors d'études in vitro ; ils ont testé l'activité de Pénicilline-Streptomycine sur l'entérocoque, et ont remarqué que l'action est meilleure si la bactérie est traitée par la Pénicilline une heure avant la Streptomycine.

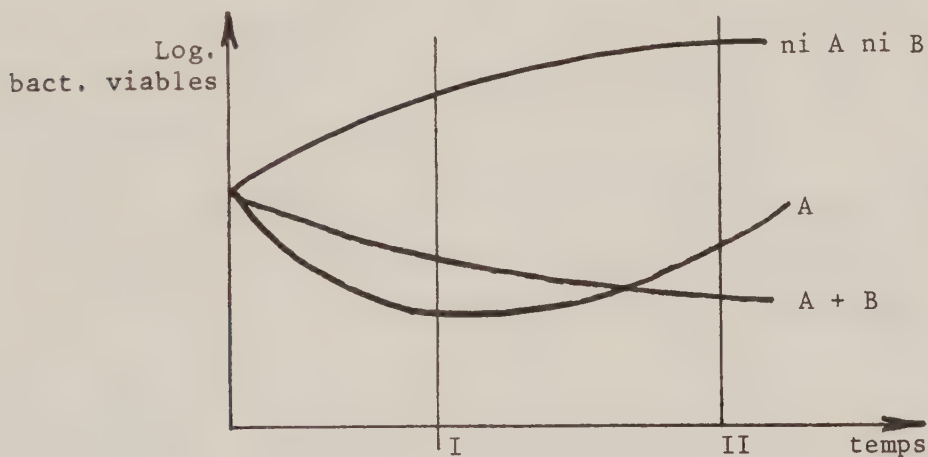
McLAUGHLIN-REEVES (85), étudiant l'association Gentamicine-Carbénicilline, ont cherché à expliquer l'inactivation de la Gentamicine par la Carbénicilline qu'ils observaient lors de tests in vitro sur des Pyocyaniques, et également lors d'essais cliniques ; ils se sont aperçus qu'il ne fallait pas mélanger les solutions d'antibiotiques 24 heures à l'avance, comme ils l'avaient fait. Ils ont également étudié si cette inactivation était fonction de la température, et ont fait incuber des mélanges à 56°C, à 35° et à température ambiante : ces mélanges contenaient 5 µg/ml de Gentamicine et 200 µg/ml de Carbénicilline : à 56°, la Gentamicine n'était plus décelable après 20 heures ; sa demi-vie à 35° était de 40 heures, et de 70 heures à la température ambiante. Il est donc recommandé de ne pas mélanger les solutions d'antibiotiques avant l'emploi, mais de les conserver séparées.

L'administration différée des antibiotiques dans le milieu d'étude in vitro nous a semblé une voie intéressante à considérer, et nous l'avons utilisée pour nos trois associations.

i) Le moment de la détermination des CMI et des CMB et de l'effet des associations

Une fois tous les paramètres déterminés, on mesure les CMI et CMB de chaque antibiotique pris séparément ; puis on fait l'association. Un point important concerne le moment au bout duquel on lit ces concentrations minimum .

JAWETZ (68) enseigne qu'au temps I, il y a moins de survivants d'un germe donné quand il est exposé à la drogue A seule que lorsqu'il est exposé à la combinaison A + B ; si on juge d'un effet bactéricide tôt l'association A + B paraît moins efficace que A seul. Par contre au temps II, il y a moins de survivants dans le tube contenant A + B que dans celui qui ne contient que A, ce qui peut être interprété comme un effet additif. L'interprétation de tels tests dépend donc de l'importance que l'on attache à la précocité de la bactéricidie, et à l'ampleur de cette bactéricidie.

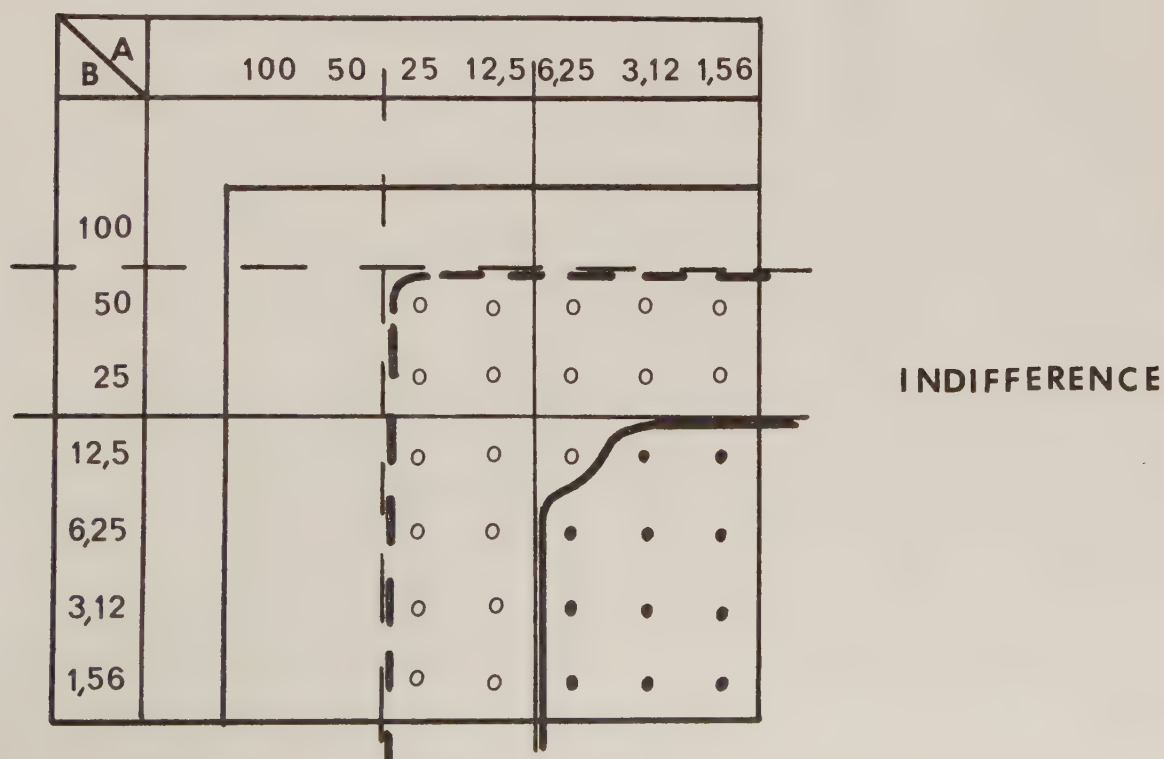


Le temps de lecture est donc intéressant. Certains auteurs (DUVAL, 43) ont ainsi étudié la dynamique de l'effet antibiotique, par détermination des courbes de croissance en présence de chaque antibiotique isolé et en présence de l'association ; après avoir effectué des numérations aux temps 2, 4, 8 et 24 heures, sur chacune des expériences concernant la Gentamicine seule à 2 µg/ml, la Carbénicilline seule à 64 µg/ml, et Gentamicine-Carbénicilline à ces mêmes concentrations, l'auteur a constaté que, pour ces deux premières expériences, il y a une brève (2 heures) inhibition de croissance, une courte bactéricidie (jusqu'à la 8ème heure), puis une multiplication bactérienne ; dans la troisième expérience, au contraire, il observe une bactéricidie rapide et durable, dont l'effet est supérieur à celui qu'il obtient avec chacun des deux antibiotiques à des concentrations doubles.

On s'accorde généralement pour effectuer la lecture des CMI et CMB 18 à 24 heures après l'ensemencement.

4 - La lecture de l'association et interprétation

Pour la méthode des dilutions en carré, on peut adopter une représentation graphique pratique puisqu'elle permet de visualiser l'effet de l'association. Selon DUVAL (42) il y a synergie en CMI (il en est de même avec les CMB), lorsque la CMI en association est obtenue avec le 1/4 de chaque antibiotique : il y a addition lorsque la CMI correspond à l'association des 1/2 CMI : il y a indifférence lorsque, au niveau de la CMI de l'association, chaque antibiotique est à une concentration égale à sa propre CMI . Il y a antagonisme lorsque l'inhibition est obtenue avec des concentrations de chaque antibiotique supérieures aux CMI individuelles : nous avons représenté trois exemples de lecture ; les tubes dans lesquels on observe une culture visible après 24 heures sont représentés par ● : si on joint les plus fortes concentrations où il y a eu culture on obtient la courbe de bactériostase . Les tubes clairs après 24 heures, mais qui ont donné, 24 heures après repiquage sur milieu solide, des colonies visibles, sont représentés par ○ : lorsque l'on joint les plus fortes concentrations, on obtient la courbe de bactéricidie : c'est la position de ces courbes, respectivement par rapport aux axes des CMI et CMB isolées, de chacun des deux antibiotiques, qui permet de dire quel est l'effet de l'association, d'une part en bactériostase, d'autre part en bactéricidie.



SYNERGIE

B \ A							
	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,5
			○	○	●	●	●
100							
50	○						
25	○						
12,5	●				○	○	
6,25	●				○	○	○
3,12	●				○	○	●
1,5	●				○	○	●

ANTAGONISME

B \ A							
	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,5
			○	○	●	●	●
100		○	○	○	○	○	○
50	○	○	○	○	○	○	○
25	○	○	○	○	●	●	●
12,5	●	○	○	●	●	●	●
6,25	●	○	○	○	●	●	●
3,12	●	○	○	●	●	●	●
1,5	●	○	○	●	●	●	●

V - LES ANTIBIOTIQUES UTILISES

Dans notre étude, nous avons utilisé trois antibiotiques : Colistine, Gentamicine et Carbénicilline.

1 - La Colistine

C'est une Polymyxine. Les Polymyxines appartiennent au groupe des antibiotiques polypeptidiques. Il en existe cinq, de A à E; on utilise pratiquement la Polymyxine B, et la E ou Colistine.

L'ensemble des Polymyxines est secrété par *Bacillus polymyxa*. Elles ont un spectre étroit : parmi les Gram négatif, *Esc. coli* et *Pseudomonas* leur sont sensibles.

Elles ont une toxicité rénale et nerveuse.

En ce qui concerne la Colistine, elle est un peu moins toxique ; elle est extraite de *Bacillus colistinus* ; du point de vue chimique, c'est un antibiotique cyclique polypeptidique : son spectre touche toutes les entérobactéries, sauf *Proteus-Providencia* ; les *Klebsiella* sont atteintes de façon variable. Elle a une très bonne action sur les *Pseudomonas* (CMI : 0,2 à 12 µg/ml sur le *Pyocyanique*) , sur *Hemophilus* et *Bordetella*.

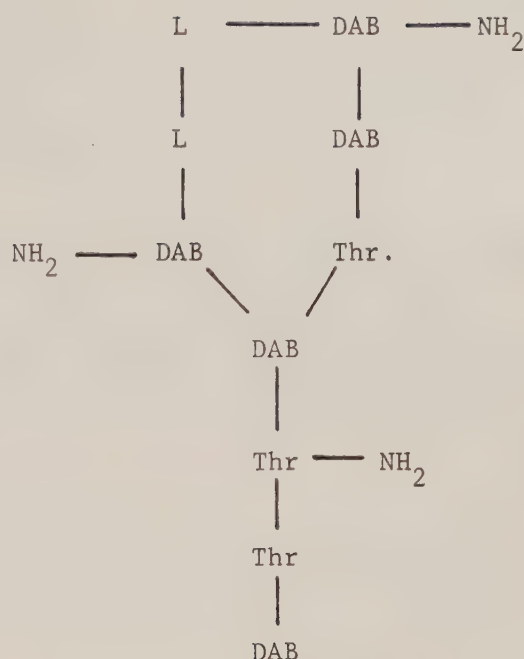
Son mode d'action se situerait au niveau du lipopolysaccharide de la membrane bactérienne.

C'est un antibiotique bactéricide fort. Il peut y avoir des mutants résistants, mais il y a souvent des mutations réverses. Il est utilisable dans les affections urinaires.

DAB = acide diamino butyrique

L = leucine

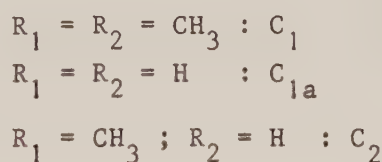
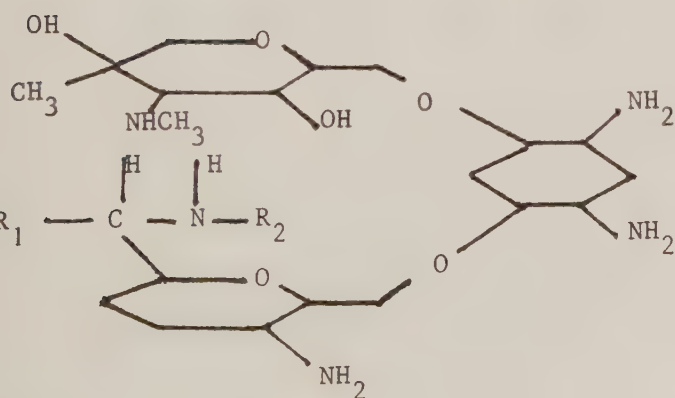
Thr = thréonine



Il existe sous forme de sulfate, qui n'est pas absorbé par l'intestin, et qui est toxique lorsqu'il est injecté par voie parentérale ; et sous forme de méthane sulfonate, moins toxique, où les groupements NH_2 ne sont plus libres, ce qui expliquerait la moins grande activité ; ce n'est qu'après un certain temps (nécessaire à la récupération de ces groupements) qu'on peut doser l'activité du sérum. Il est utilisé par voie parentérale.

2) La Gentamicine

Dans le groupe des aminosides, on distingue deux ensembles d'antibiotiques : celui de la Streptomycine, et celui de la Kanamycine : la Gentamicine appartient à ce dernier. Elle a été isolée par WEINSTEIN (133) en 1963 : elle est constituée de trois composants C_1 , C_{1a} , et C_2 : désoxystreptamine, garosamine, purpurosamine.



Son spectre antimicrobien est très large : c'est le plus large connu . Elle n'est pas active sur le Streptocoque, elle est moins active que la Kanamycine sur le BK, mais elle est active sur les Pseudomonas, et les entérobactéries sauf Proteus-Providencia.

C'est un antibiotique bactéricide puissant, agissant au niveau de la sous-unité 30s du ribosome bactérien par perturbation dans la lecture du code génétique, donc au niveau de la synthèse des protéines. Elle est active sur les germes en voie de multiplication, mais aussi sur les bactéries au repos.

Elle est sujette au phénomène de résistance, celle-ci pouvant être naturelle, ou de nature chromosomique ; elle présente la résistance croisée avec les antibiotiques du groupe.

Récemment a été décrite une résistance extra-chromosomique chez les entérobactéries (CHRISTOL, 28). Elle est administrée par voie parentérale : elle est éliminée rapidement par le rein : elle est utilisée sous forme de sulfate.

De nombreux auteurs l'ont utilisée contre le Pyocyanique en thérapeutique : SNELLING (123) chez les brûlés : MARTIN (89), BERGAN (8), GINGELL (58), COX (31), LOURIA (76) McCracken (83) le plus souvent dans des affections urinaires et dans des septicémies.

BLACH (10), SABATH (114), KLEIN (73), WAITZ (131) l'ont utilisée lors des études in vitro, contre le Pyocyanique , par les techniques précédemment décrites.

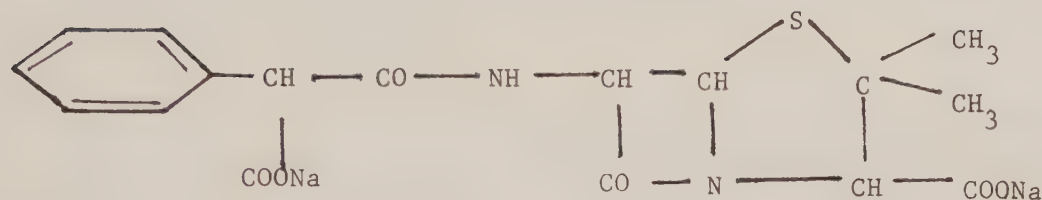
Il semble que la majorité des souches aient des CMI entre 0,8 et 6,25 µg/ml : mais elles peuvent atteindre et dépasser facilement 50-100 µg/ml.

La Gentamicine est toxique à deux niveaux : rein, oreille.

3 - La Carbénicilline

C'est une nouvelle Pénicilline de semi-synthèse (KNUDSEN (74), ROLINSON (110)), dont la formule chimique est très proche de l'Ampicilline,

et qui présente l'avantage d'avoir une certaine action sur le Pyocynique, car elle peut être employée à dose élevée.



C'est le sel disodique de l' α carboxybenzylpénicilline ; comme toutes les Pénicillines de semi-synthèse, elle est préparée par modification chimique du noyau de la Pénicilline (obtenue par culture de *Penicillium chrysogenum*), l'acide 6 aminopénicillanique, auquel on adjoint la chaîne latérale.

Le spectre antibactérien est large : sur les Gram +, elle agit sur le Staphylocoque doré, le Streptocoque, le Pneumocoque, mais moins que la Pénicilline G.

Pour les Gram -, elle est active sur *Hemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Proteus*, et certains *Esc. coli*, *Salmonella* et *Shigella* ; les *Klebsiella* lui sont résistantes.

Mais la propriété la plus importante de la Carbénicilline, est son activité sur le Pyocyanique. De nombreux résultats sont acquis, quoiqu'il apparaisse nécessaire de codifier les conditions d'expérimentation, notamment en ce qui concerne la numération et l'âge de l'inoculum utilisé, et la technique employée.

Pour certains auteurs, la Carbénicilline est un produit très actif; pour ROLINSON (110), la majorité des 206 souches qu'il a testées sont sensibles à 50 $\mu\text{g/ml}$; pour PHAIR (103), 20 % des souches nécessiteraient 62 $\mu\text{g/ml}$, les autres souches étant inhibées par 125 μg ; pour WILLIAMS (136), la majorité des souches se situeraient entre 50 et 200 μg ; pour ENGLISH (49), la Carbénicilline agirait sur les souches résistantes à l'Ampicilline : SMITH (122) assure que 85 % des souches seraient sensibles à 100 μg , contrairement à ce que trouvent BODEY-TERELL (14) qui donnent des doses beaucoup plus hautes, de même que FEKETY (51) pour qui 60 % des

souches nécessitent plus de 200 µg et qui note l'influence très importante de l'inoculum, et SILVERBLATT (119) qui remarque que 25 % seulement des souches sont sensibles.

Ces auteurs, surtout ceux qui ont contesté la sensibilité de ce germe à la carbénicilline, ont donc préconisé l'emploi d'associations contenant cet antibiotique.

Comme les β lactamines, la Carbénicilline agirait sur la dernière étape de la formation de la paroi bactérienne, par blocage de la transpeptidase qui catalyse la transpeptidation intervenant au cours de cette synthèse.

WATAKUNAKORN (132) a noté l'induction de sphéroblastes chez *Pseudomonas aeruginosa* traité par la Carbénicilline : BARNES (5) a décrit les modifications morphologiques du *Pyocyanique*, observées au microscope électronique, traité par l'antibiotique.

La Carbénicilline est un antibiotique bactériostatique ; son activité bactéricide est moins intéressante. ROLINSON (110) fait une cinétique de la bactéricidie sur le *Pyocyanique*, constate que les bactéries sont rapidement tuées ; puis la culture croît de nouveau : en présence de faibles concentrations, la culture est visible au bout de 24 heures. On peut penser à une sélection de souches résistantes dans la population d'origine : cependant, si on teste ces nouvelles souches, on ne trouve pas de modifications dans les doses. Ce serait donc peut-être une certaine inactivation de l'antibiotique.

Par contre, une résistance à la Carbénicilline apparaît lorsque l'on repique régulièrement une culture en présence de l'antibiotique.

Comme les Pénicillines, elle n'est pas métabolisée dans l'organisme, et est éliminée par l'urine. Elle est sensible à la pénicillinase staphylococcique, ce qui entraîne une certaine inactivation. Selon NEWSOM (98), il existerait deux β lactamases dans les souches de *Pyocyaniques*, dont une serait une puissante carbénillinase.

Elle peut être utilisée à de fortes doses. Si la toxicité est faible, elle existe néanmoins : BODEY (13) signale que 86 % des malades traités avec 30 g de Carbénicilline répondent avec une augmentation de transaminases : WHELTON (135) mentionne une acidose, tout en reconnaissant que la Carbénicilline, grâce à son apparente basse toxicité, peut être recommandée pour la thérapeutique d'infections à *Pseudomonas aeruginosa*, bien que de très hauts niveaux soient fréquemment nécessaires : DEMOS (38) et LURIE (79) relatent des troubles de la coagulation. RODRIGUEZ (108) suivait quotidiennement ses malades traités à la Carbénicilline par la numération globulaire et la formule leucocytaire, et des dosages biochimiques : urémie, créatinines sanguine et urinaire, transaminases sériques. Il estimait que les clearances étaient suffisantes pour juger de l'efficacité du traitement, ce que contestent CALHOUN (24) et BERGAN (8) qui prétendent qu'elles sont insuffisantes pour juger des concentrations sériques des antibiotiques notamment chez les insuffisants rénaux.

Les trois antibiotiques que nous venons de considérer présentent donc une toxicité, à des degrés divers : c'est une raison supplémentaire pour voir si on peut les associer.

VI - CONCLUSION

Pseudomonas aeruginosa est un bacille gram négatif, très mobile à l'examen direct (grâce à un flagelle polaire). Aérobie strict, c'est un germe facilement repérable tant en bouillon (grâce à son voile) que sur milieu solide (grâce à ses colonies éventuellement pigmentées et à leur reflet métallique).

Il est redouté, car son pouvoir pathogène s'est considérablement développé depuis l'avènement de l'antibiothérapie : l'usage immodéré des antibiotiques a en effet abouti à la sélection de germes multi-résistants : le Pyocyanique fait partie de ces germes que l'on a qualifiés d'agents de "surinfection" : alors qu'il vit en saprophyte dans l'organisme, il prend très facilement un rôle très pathogène dès que cet organisme est en état de moindre défense. C'est ainsi qu'il sévit particulièrement dans les services de réanimation (contaminations à la suite de manipulations instrumentales), de chirurgie, d'hémodialyse, et également dans les services où sont soignées les némopathies.

Peu d'antibiotiques sont actifs sur *Pseudomonas aeruginosa*. Actuellement trois produits doivent être essayés : la Colistine, la Gentamicine, la Carbénicilline. Dans le triple but : d'élargir un spectre (le Pyocyanique n'est pas forcément seul dans une infection) — d'agir plus efficacement sur le germe, et de diminuer les doses à administrer, les associations entre ces antibiotiques sont préconisées : mais avant d'en prescrire une, il faut voir si l'on peut espérer une synergie d'action sur la souche en cause ; c'est pour cela que l'isolement de la souche est nécessaire, et que l'on apprécie ensuite, par des tests *in vitro*, la puissance d'action, en bactériostase et en bactéricidie, de ces associations : c'est à la suite de ces tests que l'on peut conclure de l'opportunité d'engager une telle thérapeutique plutôt que le traitement par un antibiotique isolé.

DEUXIEME PARTIE

I - MATERIEL ET METHODES

1) Description de la méthode des dilutions en carrés utilisée

A B		x	x/2	x/4	x/8	x/16	x/32	x/64
		a ₁	a ₂	a ₃	a ₄	a ₅	a ₆	a ₇
y	b ₁	1	2	3	4	5	6	7
y/2	b ₂	8	9	10	11	12	13	14
y/4	b ₃	15	16	17	18	19	20	21
y/8	b ₄	22	23	24	25	26	27	28
y/16	b ₅	29	30	31	32	33	34	35
y/32	b ₆	36	37	38	39	40	41	42
y/64	b ₇	43	44	45	46	47	48	49

Dans cette technique, en milieu liquide, on prépare tout d'abord des concentrations décroissantes, par passages de deux en deux, pour chaque antibiotique, A et B : nous avons utilisé 7 tubes dans toutes nos expériences : ainsi, l'antibiotique A varie de la concentration de départ x jusqu'à x/64 ; l'antibiotique B varie de y à y/64 ; chaque concentration de A est couplée à toutes les concentrations de B, et inversement : donc, avec 49 tubes, on met en pré-

sence toutes les concentrations des deux antibiotiques : par exemple, x/4 est avec y/16 dans le tube 31 .

De plus, dans les tubes a₁ à a₇, nous ne mettrons que les diverses concentrations de A, de façon :

1) à vérifier, à chaque test, que les CMI et CMB de A n'avaient pas varié, lorsque le milieu d'étude était inchangé ;

2) à déterminer éventuellement les nouvelles CMI et CMB de A lorsque nous avons fait varier la composition de notre milieu.

Nous faisons de même pour B, dans les tubes b_1 à b_7 .

2) Souches bactériennes

Pour étudier l'influence de la variation de différents paramètres lors de l'étude in vitro d'associations d'antibiotiques, nous avons préféré choisir une souche "sauvage" de Pyocyanique plutôt qu'une souche de collection, en raison de la moins grande sensibilité aux antibiotiques des souches isolées à l'hôpital dans les différents produits pathologiques.

La souche que nous avons retenue a été isolée à l'hôpital Edouard-Herriot, au laboratoire de bactériologie, à partir d'un pus de cheville. A l'antibiogramme, elle était résistante à la Gentamicine : en milieu hospitalier, il existe fréquemment de tels Pyocyaniques, et une association est indiquée dans ces cas. De plus, comme elle se révélait à peine sensible à la Colistine, nous avons gardé cet antibiotique. Enfin, nous avons décidé d'associer à ces deux produits la Carbénicilline puisque cette Pénicilline, introduite depuis peu de temps en thérapeutique, est déjà largement utilisée dans les services, notamment en chirurgie et en réanimation.

Nous avons aussi utilisé une souche hautement résistante à la Gentamicine, de façon à voir si l'une de ces trois associations pouvait en venir à bout. Cette souche a été isolée à l'hôpital Cardiologique.

3) Le milieu d'étude

a) Milieux de culture des souches

Nous avons conservé ces souches sur milieu "de conservation" fourni par l'Institut Pasteur :

extrait de viande	5 g
peptone	10 g
chlorure de sodium	3 g
$\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}, 12 \text{ H}_2\text{O}$	2 g
Gélose	10 g
H_2O qsp	1000 ml
pH = 7,4	

A partir de l'isolement initial, nous avons repiqué cent tubes de ce milieu (chaque fois avec une colonie isolée) : après mise à l'étuve de 24 heures, ces tubes ont été placés à 4°C . Pour chaque nouvelle expérience, nous réisolions la souche à partir de l'un de ces tubes de conservation : nous étions ainsi assurés d'avoir un germe présentant les mêmes caractéristiques tout au long de l'expérimentation, ce qui n'est pas toujours le cas lorsque l'on travaille à partir de souches lyophilisées.

Une fois notre souche réisolée sur milieu solide (Gélose nutritive 1,5 % de BD MERIEUX, c'est-à-dire le Nutrient Agar de BBL), nous reprenions UNE colonie que nous mettions en culture sur 5 ml de milieu de Mueller-Hinton liquide : ce milieu était préparé par dilution de 22 g de Mueller-Hinton BBL, division of Bioquest, dans un litre d'eau distillée stérile. (Ce milieu était alors réparti en flacons stériles, et immédiatement autoclavé à 115°C pendant 20 minutes, puis placé à l'étuve à 37°C pour contrôle pendant 24 heures, enfin conservé à 4°C).

b) Milieu de l'expérience

Nous avons utilisé comme milieu de base le milieu de Mueller-Hinton liquide, auquel nous avons adjoint successivement différents constituants que nous verrons plus loin. Nous avons aussi effectué des tests :

- sur sérum humain, fourni par le Centre de Transfusion sanguine de Beynost,
- sur sérum de poulain, de BD-Merieux.

c) Milieu de repiquage

Pour évaluer la bactériostase nous repiquions tous les tubes où il n'y avait pas de culture visible après 24 heures d'incubation, sur milieu solide : gélose nutritive 1,5 % , la même que celle qui servait à l'isolement.

4) Les antibiotiques

Au début de notre travail, nous avons préparé des solutions-mères pour chacun des trois antibiotiques :

pour la Gentamicine, elle était à	2 000	µg/ml ;
pour la Colistine ,	2 000	µg/ml ;
pour la Carbénicilline,	20 000	µg/ml .

Chaque dilution d'antibiotique, dans l'expérience en carré, était distribuée sous un volume de 0,1 ml : comme nous mettions deux antibiotiques par tube, et 1,8 ml de Mueller-Hinton ensemencé avec le Pyocyanique, la dilution effective de chaque antibiotique était donc le 1/20° de celle du départ. Ainsi, pour avoir par exemple 100 µg/ml de Carbénicilline dans un tube, il fallait préparer une concentration de 2 000 µg/ml, soit faire une dilution 1/10 de la solution-mère.

Comme nous avons remarqué, à nos dépens d'ailleurs, que le fait de décongeler et recongeler successivement les solutions de titre connu, faisait varier ce titre, il fallait préparer à chaque expérience les dilutions nécessaires pour chaque antibiotique à partir de la solution-mère.

Celles-ci étaient donc conservées à - 20°C, sous des volumes de 1 ml ; et nous préparions extemporanément à chaque essai la première concentration nécessaire, par dilution de cette solution-mère : les concentrations suivantes étaient obtenues par passages de 2 en 2 dans de l'eau distillée : ainsi les concentrations finales utilisées ont été :

- 1) pour la Colistine : 10, 5, 2,5, 1,25 , 0,62, 0,31, 0,15 µg/ml,
- 2) pour la Gentamicine : 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,62, 0,31 µg/ml,
- 3) pour la Carbénicilline : 200, 100, 50, 25, 12, 6,25 3,12 µg/ml.

Pour l'expérience n° 15, nous avons préparé des solutions-mères beaucoup plus concentrées, puisque la souche alors testée était hautement résistante ; ces solutions étaient :

pour la Colistine à	10 000	µg/ml,
pour la Gentamicine à	20 000	µg/ml,
pour la Carbénicilline à	80 000	µg/ml.

5) Le protocole opératoire

a) La répartition des antibiotiques

Pour chaque expérience, nous utilisions un tube de solution congelée de chacun des trois antibiotiques : ces solutions-mères étaient alors diluées en eau distillée stérile de façon à obtenir, pour chacune, la concentration la plus élevée que nous désirions ; à partir de celle-ci, nous faisions les passages de deux en deux en eau distillée stérile. Nous avions ainsi les sept concentrations voulues pour Colistine, Gentamicine, Carbénicilline. Ces concentrations étaient ensuite réparties sous un volume de 0,1 ml conformément au schéma des dilutions en carré, soit trois carrés par expérience, puisqu'il fallait associer deux à deux trois antibiotiques.

b) Préparation et répartition de l'inoculum.

48 heures auparavant, la souche était isolée sur gélose solide à partir de son milieu de conservation ; 24 heures plus tard, une colonie était repiquée sur 5 ml de Mueller-Hinton liquide, et mise à l'étuve à 37°C. Le jour de l'expérience, et TROIS heures avant celle-ci, nous reprenions une oese (calibrée, toujours la même) de la culture de 24 heures, que nous repiquions de nouveau sur 5 ml de Mueller-Hinton liquide ; après trois heures de culture à 37°C, nous préparions notre inoculum par dilution au 1/100° de cette culture, ce qui nous fournissait un inoculum d'environ 500 000 germes/ml : le contrôle effectué à chaque fois par numération sur gélose nutritive 1,5 % a montré que nous étions toujours autour de cette valeur . Cet inoculum était ensuite réparti dans tous les tubes (qui avaient entre-temps reçu les antibiotiques) sous un volume de 1,8 ml.

Nous effectuions également un contrôle de la pureté de la souche, par étalement d'une goutte de l'inoculum sur une boîte de gélose ordinaire, afin de nous assurer qu'aucune contamination n'avait eu lieu entre le repiquage à partir du milieu de conservation et la dilution 10^{-2} de la culture de 3 heures.

c) Incubation

Les portoirs étaient placés à l'étuve 24 heures à 37°C : on lisait alors les CMI ; puis grâce à des stries de 5 cm, on effectuait le repiquage de tous les tubes clairs sur gélose: 24 heures plus tard, après

mise à l'étuve à 37°C, on lisait les CMB (la CMB retenue était la concentration ne laissant aucun survivant dans l'échantillon repiqué).

6) *Lecture et interprétation des résultats*

Après avoir tracé les courbes de bactériostase et bactéricidie, nous constatons l'effet des associations conformément aux règles suivantes :

- il y a synergie lorsque la CMI (ou la CMB) en association est obtenue avec le quart des CMI de chaque antibiotique ,
- il y a addition lorsqu'elle l'est avec la moitié seulement,
- il y a indifférence lorsque , au niveau de l'association, chaque antibiotique est à une concentration égale à sa propre CMI ,
- il y a antagonisme lorsque l'inhibition est obtenue avec des concentrations de chaque antibiotique supérieures aux CMI individuelles.

Tout ceci est également valable pour la bactéricidie : nous avons donc évalué l'effet des trois associations aussi bien en bactériostase qu'en bactéricidie.

II - VARIATIONS EXPERIMENTALES DES DIFFERENTS PARAMETRES

1) *Modifications chimiques du milieu*

Nous avons d'abord étudié nos trois associations sur milieu de Mueller-Hinton normal, au cours du groupe n° 1 d'expériences.

Nous avons ensuite fait varier la composition de ce milieu, en y adjoignant certains constituants que l'on rencontre dans le sérum humain : il nous a en effet paru intéressant d'essayer de se rapprocher un peu de sa composition, puisque c'est par voie générale que sont administrés ces antibiotiques. Nous avons ainsi étudié :

- l'influence du calcium : expériences 2 et 3,
- l'influence du potassium : expériences 4,
- l'influence de l'urée : expériences 5,
- l'influence du sérum humain : expériences 6,
- l'influence du sérum de poulain : expériences 7.

2) Les deux antibiotiques introduits à des temps différents

C'est le deuxième point important à notre sens, dans l'étude *in vitro* d'une association. En fait, on peut se contenter de distribuer les antibiotiques, toutes dilutions faites, dans le milieu d'étude, et de mettre ensuite l'inoculum.

Il était intéressant de voir ce qui se passerait si l'on n'introduisait pas les deux antibiotiques simultanément, mais l'un après l'autre. Ainsi, considérant deux drogues A et B, on peut mettre d'abord A et, au bout d'un certain délai d'incubation (l'inoculum a été distribué tout de suite après A), on met B. Dans une deuxième expérience, on intervertit l'ordre : on met B avant A.

C'est ce que nous avons fait dans les séries d'expériences 8 et 9 lorsque le temps séparant l'administration des deux antibiotiques a été fixé à trois heures ; dans les expériences 10 et 11, nous les avons séparés de six heures. Nous verrons que les résultats sont, selon les associations, extrêmement différents.

3) L'inoculum

Nous avons également examiné l'influence de l'inoculum, c'est-à-dire l'influence de deux paramètres :

a) le nombre de bactéries dans les expériences n° 12, nous avons effectué les trois associations avec un inoculum très faible : 240 germes/ml.

Dans les expériences n° 13, nous avons au contraire utilisé un inoculum très lourd : $9 \cdot 10^6$ germes/ml.

b) L'âge des bactéries ; dans toutes les expériences, nous avons testé des bacilles *Pyocyaniques* en pleine phase de croissance exponentielle : dans les expériences n° 14, nous avons utilisé des bactéries en phase stationnaire, prises dans une culture de 24 heures.

4) L'utilisation d'une souche très résistante

Nous avons examiné, dans l'expérience n° 15, l'effet des associations retenues sur cette souche ; nous l'avons étudiée en phase de

: culture visible après 18 heures d'incubation dans un milieu liquide :

: colonies visibles après 24 heures , sur milieu solide, après repiquage à partir d'un tube clair après 18 heures.

Ainsi la concentration immédiatement supérieure au dernier donne la CMI ; la concentration immédiatement supérieure au dernier donne la CMB.

Nous avons donc commencé par tester notre souche vis-à-vis de la Colistine, de la Gentamicine, et de la Carbénicilline. Nous avons trouvé les résultats suivants, avec un inoculum de 1,9 ml d'une dilution 1/100° d'une culture de 3 heures, et 0,1 ml de concentrations 20 fois supérieures à celles qui sont affichées dans le tableau.

Colistine	20	10	5	2,5	1,25	0,62	0,31
					•	•	•
			o	c			
Gentamicine	20	10	5	2,5	1,25	0,62	0,31
					•	•	•
			o	c			
Carbénicilline	200	100	50	25	12,5	6,2	3,1
			•	•	•	•	•
			o				

Les résultats pour les trois antibiotiques sont donc les suivants , en µg/ml :

	CMI	CMB
Colistine	2,5	10
Gentamicine	2,5	10
Carbénicilline	100	200

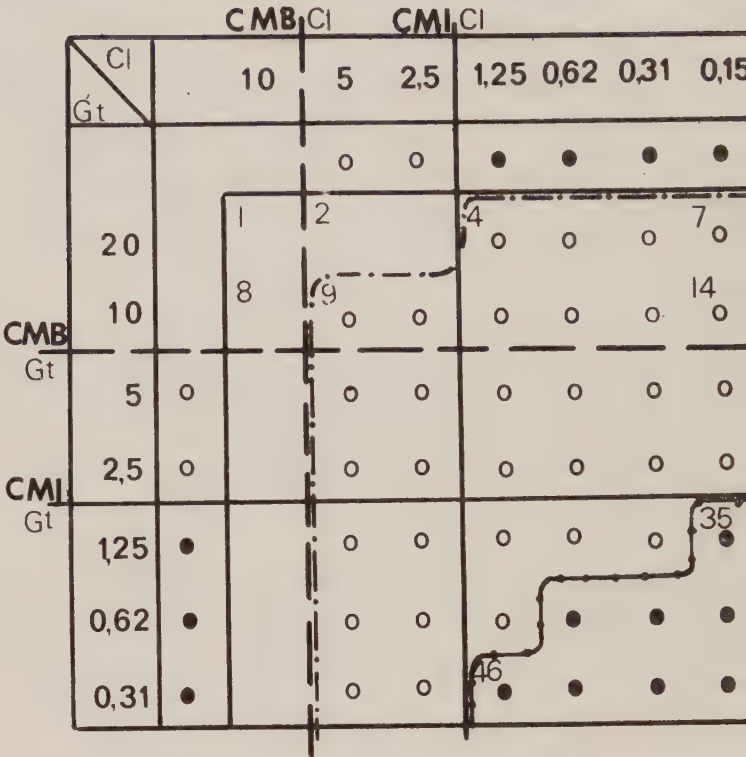
FIGURE n°1
LES ASSOCIATIONS TYPES

MILIEU: Mueller-Hinton normal

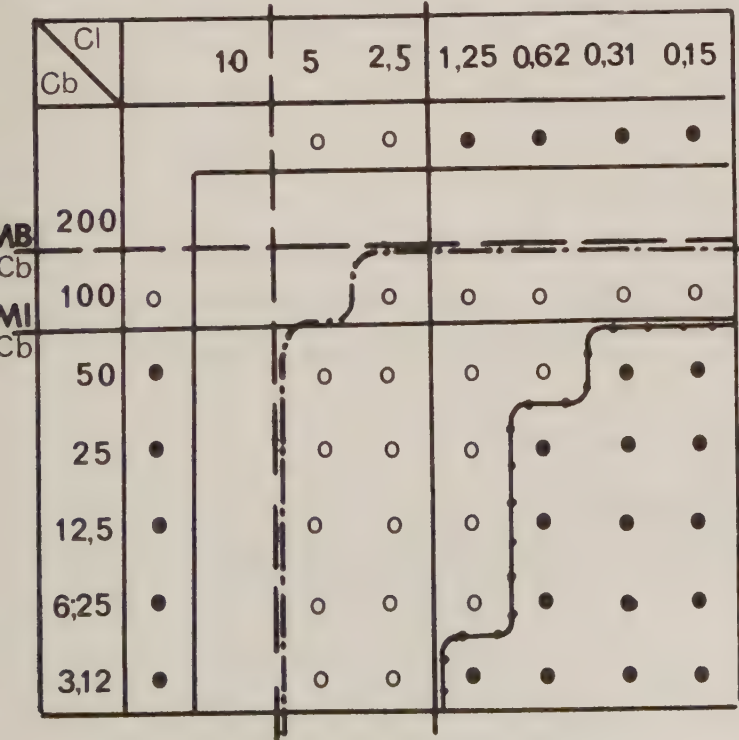
INOCULUM: dilution 1/100° d'une culture de 3 heures, soit 430 000 germes/ml;

ANTIBIOTIQUES: administrés tous (µg/ml) deux avant l'en-
-semencement bactérien

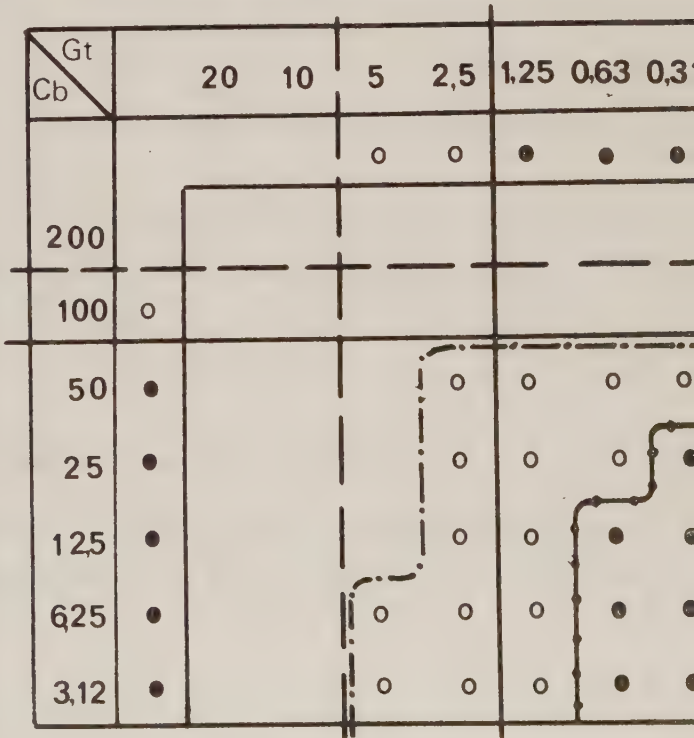
COLISTINE - GENTAMICINE



COLISTINE - CARBENICILLINE



GENTAMICINE - CARBENICILLINE



- L'effet des associations entre les trois antibiotiques : c'est le groupe n° 1 d'expériences.

L'examen des courbes fait ressortir les résultats suivants :

1) L'association Colistine-Gentamicine :

a) en bactériostase, on peut observer un effet un peu meilleur qu'une indifférence, mais qui n'est cependant pas une addition. Cependant, pratiquement, on pourrait utiliser 0,31 µg/ml de Colistine et 1,25 µg/ml de Gentamicine, ce qui produirait la bactériostase, alors que, pour chacun de ces deux antibiotiques isolés, celle-ci n'était obtenue qu'avec une concentration de 2,5 µg/ml.

b) en bactéricidie, on observe un très net antagonisme, vis-à-vis de la Gentamicine. En effet, la courbe est située deux dilutions au-dessus de la CMB de cet antibiotique, et l'effet global est donc indiscutable. Pour la Colistine par contre, la courbe suit l'axe de la CMB pour cet antibiotique isolé.

Cette association ne pourrait donc pas être recommandée pour utilisation contre cette souche puisque, en présence de Colistine, la CMB de la Gentamicine est passée de 10 à 40 µg/ml.

2) L'association Colistine-Carbénicilline :

a) en bactériostase : l'effet obtenu est là aussi intermédiaire entre une indifférence et une addition.

b) Mais en bactéricidie, l'indifférence est quasi parfaite.

L'utilisation de cette association peut donc, à la rigueur, être justifiée pour assurer une bactériostase, en prenant 1,25 µg/ml de Colistine et 6,25 µg/ml de Carbénicilline, ou 0,62 µg de Colistine et 25 µg de Carbénicilline.

3) L'association Gentamicine-Carbénicilline :

a) en bactériostase, on observe une très bonne addition puisque, pratiquement, cette bactériostase peut être obtenue avec 0,62 µg/ml

de Gentamicine et 25 µg/ml de Carbénicilline, ce qui abaisse de quatre fois les CMI de chacun de ces deux antibiotiques

b) en bactéricidie, nous relevons aussi une addition : la synergie souvent rapportée par les auteurs n'a pas été retrouvée sur la souche choisie.

On peut donc dire que cette souche n'est pas très sensible aux trois associations envisagées, sur ce Pyocyanique :

- 1) Gentamicine et Colistine sont ANTAGONISTES,
- 2) Colistine et Carbénicilline sont INDIFFERENTES,
- 3) Gentamicine et Carbénicilline sont ADDITIVES.

Le but de notre étude s'est donc trouvé confirmé : il s'agissait :

- 1) de voir si certains paramètres rencontrés dans le sérum et absents du milieu de Mueller-Hinton pouvaient modifier ces résultats,
- 2) d'essayer de trouver des conditions permettant d'améliorer ces résultats.

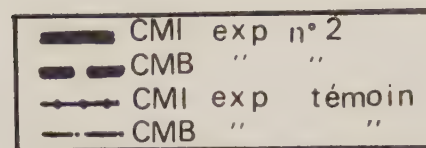


FIGURE n° 2

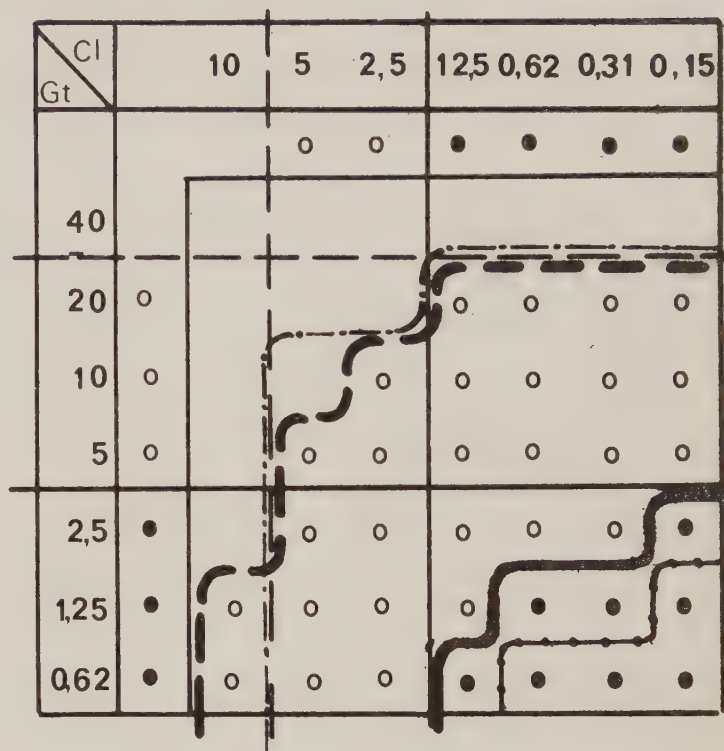
INFLUENCE DU CALCIUM

MILIEU : Mueller - Hinton + 24mg/l de calcium;

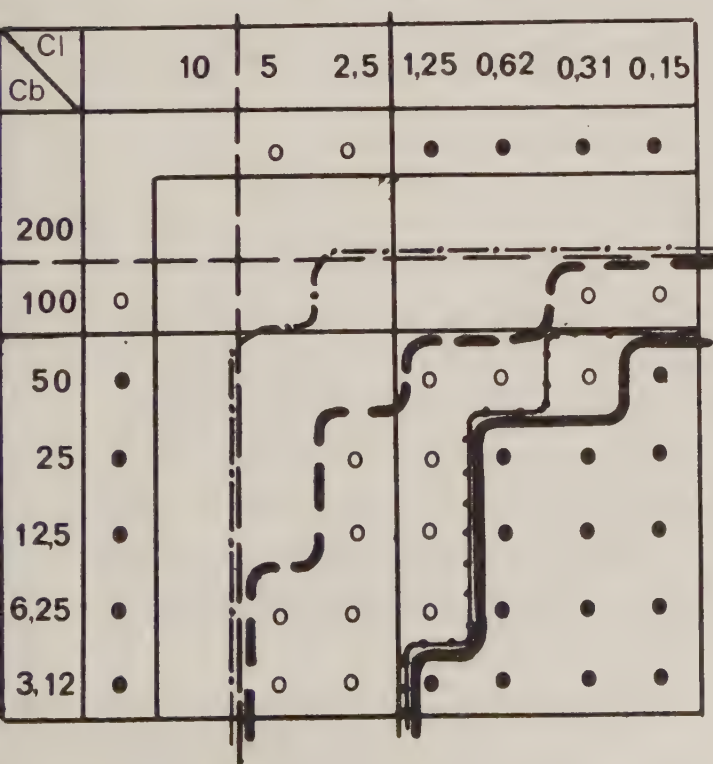
INOCULUM: dilution 1/100° d'une culture de 3 heures, soit 620 000 germes /ml;

ANTIBIOTIQUES: administrés tous deux avant l'en-
(µg/ml) semencement bactérien

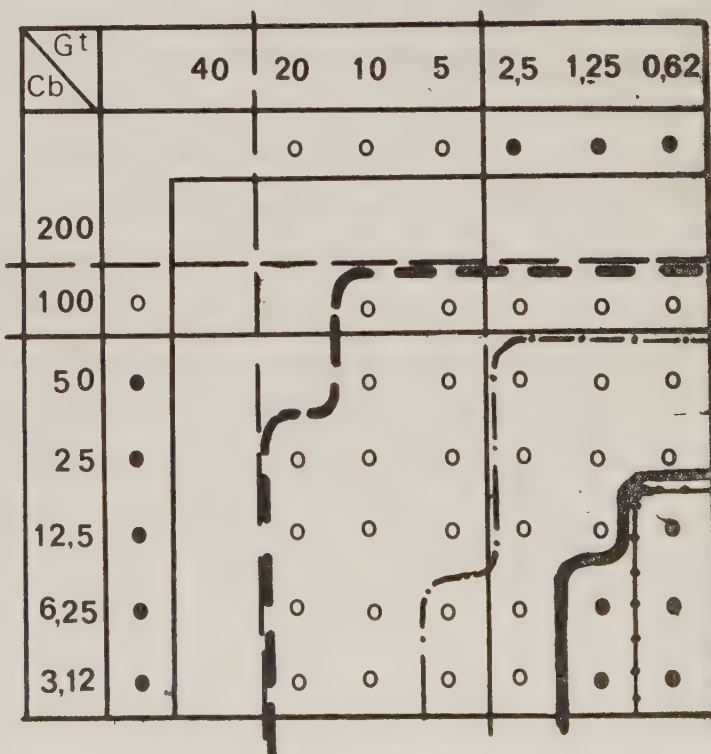
COLISTINE - GENTAMICINE



COLISTINE - CARBENICILLINE



GENTAMICINE - CARBENICILLINE



2) La variation de divers paramètres

1) Modifications dans la nature chimique du milieu

A - LE CALCIUM :

a) Expériences n° 2, figure n° 2 :

Nous avons introduit dans le milieu de Mueller-Hinton du calcium sous forme de gluconate ; la détermination au laboratoire de cette teneur a été trouvée à 24 mg/l.

	CMI sur MH + Ca	CMI sur MH normal	CMB MH + Ca	CMB MH normal
Colistine	2,5	2,5	10	10
Gentamicine	5	2,5	40	10
Carbénicilline	100	100	200	200

Nous constatons que seules les CMI et CMB de la Gentamicine ont été modifiées : la CMI a été multipliée par 2, et la CMB par 4. L'augmentation de la résistance du Pyocyanique à la Gentamicine en présence de calcium, qui est classiquement observée, est donc bien retrouvée pour notre souche .

1) L'association Colistine-Gentamicine :

Les courbes en bactériostase et en bactéricidie sont pratiquement superposables avec celles que nous avons relevées lorsque nous avons testé la souche sur le milieu de Mueller-Hinton normal , qui ne contenait que des traces de calcium. On peut donc en conclure que, malgré l'augmentation des CMI-CMB de la Gentamicine due à la présence du calcium, l'association a la même valeur qu'en l'absence de calcium. Pourtant, du fait du déplacement des axes de bactériostase et bactéricidie de la Gentamicine, le résultat de l'association pourrait être interprété, non plus comme un antagonisme, mais comme une indifférence.

2) L'association Colistine-Carbénicilline

Ici, les courbes sont superposables en bactériostase; mais en bactéricidie, on note une amélioration dans l'action, puisque l'effet devient meilleur qu'une indifférence : c'est presque une addition.

3) L'association Gentamicine-Carbénicilline

En bactériostase, la courbe est déplacée légèrement du côté des basses concentrations de Carbénicilline, de sorte que l'on peut désormais considérer que ces deux antibiotiques sont synergiques.

Mais en bactéricidie, l'association présente une action nettement moins bonne que l'addition que nous avons admise lorsqu'il n'y avait pas de calcium dans le milieu de Mueller-Hinton; nous pouvons en effet observer un décalage de la courbe vers les fortes concentrations, de sorte que l'addition précédemment relevée est devenue une indifférence.

b) Expérience n° 3 :

Le calcium, toujours sous forme de gluconate, a été administré en plus grande quantité : sa teneur a été cette fois trouvée à 153 mg/l.

Nous n'avons pas représenté les courbes, car nous avons constaté qu'il n'était pas possible de déterminer les CMB, ni même les CMI, pour tous les antibiotiques, que nous avons répartis aux concentrations habituelles.

Les trois associations ont donc été fortement inactivées par ce taux élevé de calcium : on peut donc recommander de ne pas faire d'injections de calcium en même temps que ces antibiotiques, dont on inhiberait alors grandement l'action.

L'étude de ces deux séries d'expériences montre bien que le calcium joue un rôle important sur l'activité des antibiotiques.

Une teneur faible modifie le résultat de l'association partiellement bénéfique qu'était Gentamicine-Carbénicilline qui, d'une addition, passe à une indifférence ; par contre, Colistine-Carbénicilline a été améliorée, puisque nous sommes passés d'une indifférence à une addition ; Colistine et Gentamicine sont devenues indifférentes.

Une teneur très élevée (153 mg/l de calcémie ne se rencontre cependant pas en biologie) augmente considérablement les CMI-CMB de notre souche aux trois antibiotiques.

GILBERT (57) l'avait bien montré en ce qui concerne la Gentamicine. Il y aurait deux explications à cela :

1) l'effet porterait sur la bactérie : pour GILBERT, si on expose la bactérie à l'EDTA, celui-ci capte le calcium de la paroi (il sert à stabiliser le lipopolysaccharide pariétal) : *Pseudomonas aeruginosa*, initialement résistant à la Pénicilline et à l'Ampicilline, leur devient tout à fait sensible. De plus, l'influence de l'EDTA est réversible, par addition de calcium dans le milieu. Il est raisonnable de poser comme hypothèse que la perméabilité, et donc la sensibilité, à la Gentamicine diminueraient quand le calcium du milieu et de la membrane cellulaire augmenterait.

2) Une autre explication serait qu'il se forme des chélates de Gentamicine avec le calcium et, comme corollaire, qu'elle perd son activité antimicrobienne.

Il n'est actuellement pas possible de trancher entre les deux hypothèses. Le fait que nous ayons pu faire la même observation que GILBERT (c'est-à-dire constater une augmentation de la résistance à un antibiotique lorsque l'on est en présence de calcium) avec TROIS antibiotiques de nature chimique différente, serait peut-être en faveur de la première.

	CMI	exp	n°4
	CMB	"	"
	CMI	"	témoi n
	CMB	"	"

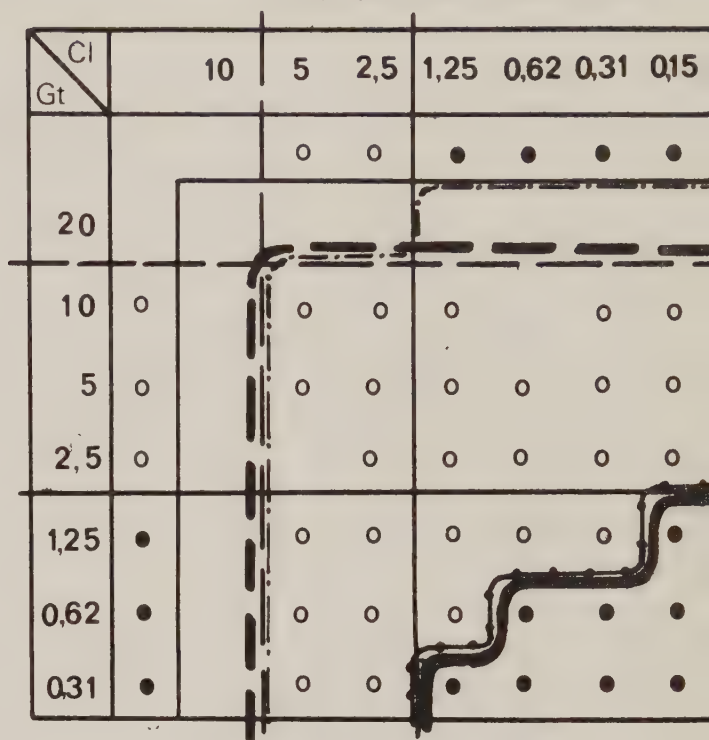
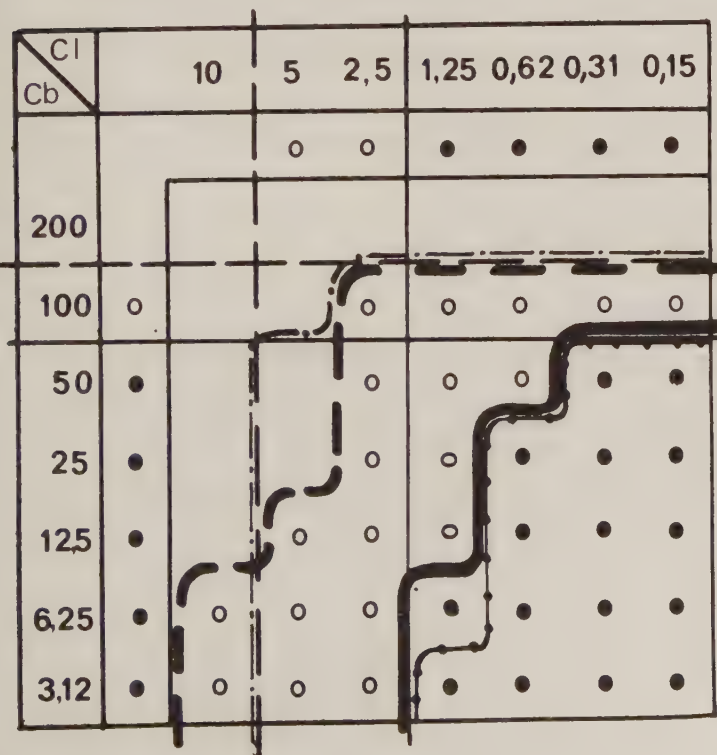
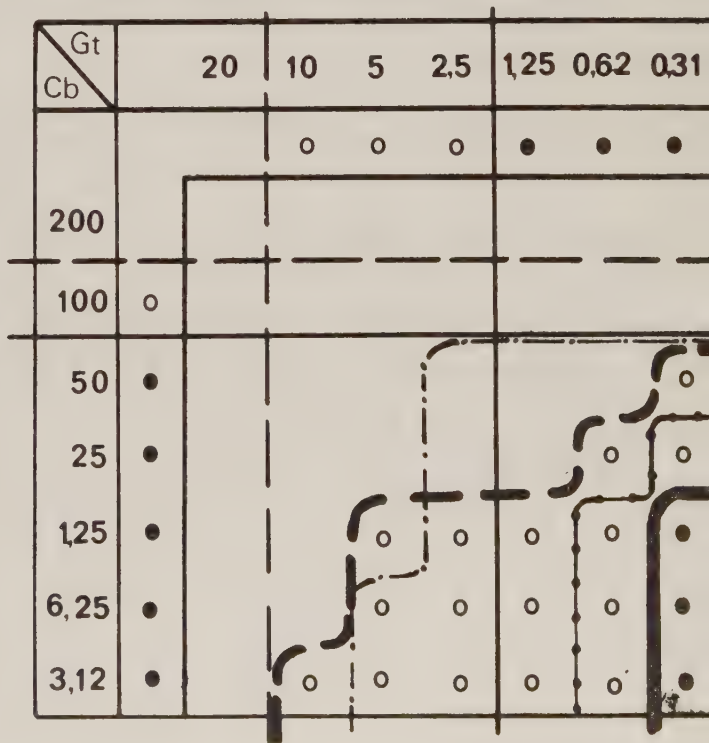
FIGURE n° 3

INFLUENCE DU POTASSIUM

MILIEU : Mueller-Hinton + 10meq/l de potassium;

INOCULUM: dilution 1/100° d'une culture de 3 heures, soit 570 000 germes/ml;

ANTIBIOTIQUES: administrés tous (µg/ml) deux avant l'en-semencement bactérien.

COLISTINE_GENTAMICINE**COLISTINE - CARBENICILLINE****GENTAMICINE-CARBENICILLINE**

B - LE POTASSIUM : Expériences n° 4, figure n° 3

Nous avons introduit ce paramètre car, avec l'urée, la kaliémie est augmentée parfois de façon considérable chez les urémiques. Or, très souvent ces malades sont sujets à des infections à *Pyocyanique*. Il est donc intéressant de voir si les associations sont susceptibles d'applications dans ce cas particulier.

Le potassium a été apporté sous forme de chlorure. Sa détermination biochimique a été trouvée à 10 meq/l.

Les CMI et CMB pour chaque antibiotique ont été les suivantes :

	CMI sur MH + Pot.	CMI sur MH normal	CMB sur MH + Pot.	CMB sur MH normal
Colistine	2,5	2,5	10	10
Gentamicine	2,5	2,5	20	10
Carbénicilline	100	100	200	200

Ces concentrations ont donc été conservées en général ; seule la CMB de la Gentamicine a été augmentée d'une dilution, mais ce résultat n'est pas significatif.

a) L'association Colistine-Gentamicine

- En bactériostase, les courbes sont exactement superposables;
- En bactéricidie, on note cette fois que les tubes qui contenaient 20 µg/ml de Gentamicine n'ont plus présenté de colonies après repiquage sur milieu solide, ce qui entraîne une modification dans le résultat de l'association : elle devient un exemple typique d'indifférence, remplaçant, en l'améliorant, l'antagonisme précédemment enregistré.

b) L'association Colistine-Carbénicilline

Les courbes en CMI et CMB sont tout à fait comparables : on maintient une indifférence .

c) L'association Gentamicine-Carbénicilline

On a une amélioration en CMI ; en CMB, on a cette fois une bonne synergie.

Une teneur en potassium élevée aurait donc tendance à améliorer le résultat des associations envisagées. Si cette amélioration n'est qu'apparente pour Colistine-Gentamicine (d'un antagonisme on passe à une indifférence, à cause de l'augmentation de la résistance à la Gentamicine), elle est par contre évidente pour Gentamicine-Carbénicilline, qui devient réellement une association synergique.

Ces résultats sont donc encourageants pour une utilisation en thérapeutique chez les urémiques, d'autant que ces actions peuvent être obtenues avec des taux d'antibiotiques qu'il est possible d'atteindre en thérapeutique. Ainsi, pour l'association Gentamicine-Carbénicilline, il est intéressant d'associer 1,25 µg/ml de Gentamicine avec 25 µg/ml de Carbénicilline : ces doses sont loin des doses limites de toxicité, ce qui justifie pleinement l'emploi d'une telle association.

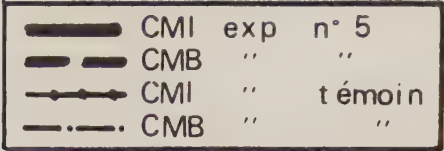


FIGURE n°4

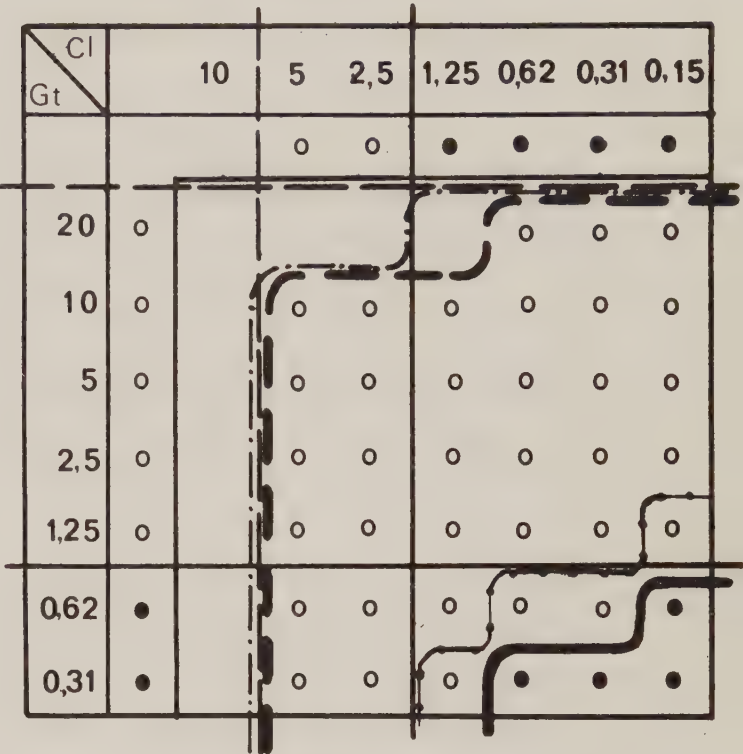
INFLUENCE DE L' UREE

COLISTINE-GENTAMICINE

MILIEU : Mueller -Hinton + 4,50 g/l d'urée;

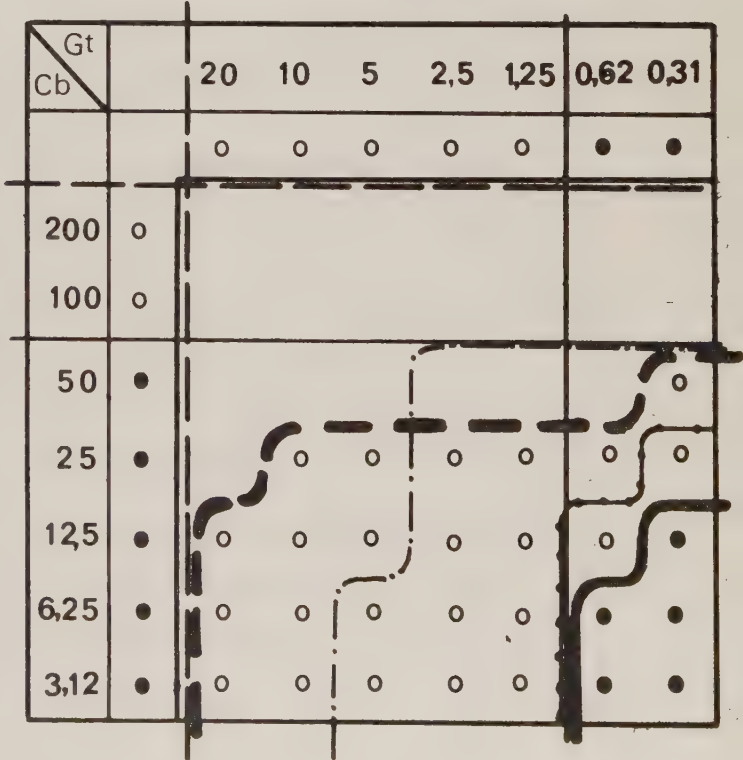
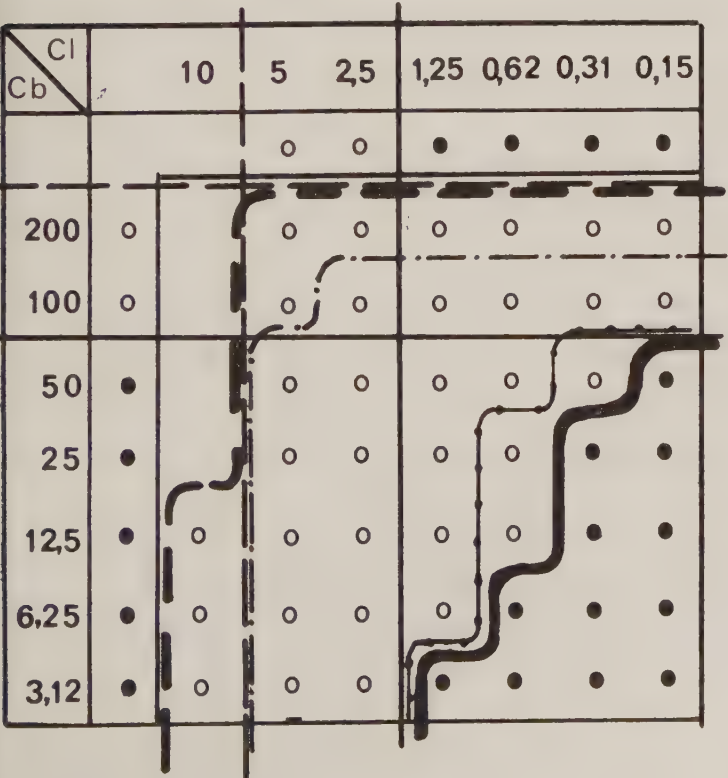
INOCULUM: dilution 1 / 100° d'une culture de 3 heures, soit 550 000 germes / ml;

ANTIBIOTIQUES : administrés tous (µg / ml) deux avant l'en-
-semencement bactérien.



COLISTINE -CARBENICILLINE

GENTAMICINE-CARBENICILLINE



C - Influence de l'UREE : Expériences n° 5, figure n° 4

Nous avons ajouté 4,50 g/l d'urée à notre milieu. Au point de vue biochimique, ce milieu contenait : sodium : 118 meq/l , potassium : 3,8 meq/l , urée : 4,50 g/l , calcium : traces.

Les CMI et CMB des antibiotiques isolés ont été les suivants :

	CMI sur MH + urée	CMI sur MH normal	CMB sur MH + urée	CMB sur MH normal
Colistine	2,5	2,5	10	10
Gentamicine	1,25	2,5	40	10
Carbénicilline	100	400	100	200

Nous constatons donc que la sensibilité à la Colistine n'est pas modifiée ; que celle à la Gentamicine , en bactériostase, est abaissée d'une dilution, mais qu'en bactéricidie, notre souche est beaucoup plus résistante, puisque la CMB passe à 40 µg/ml ; et que la sensibilité à la Carbénicilline a également diminué en bactéricidie , la CMB de cet antibiotique étant doublée par rapport à ce qu'elle était sur milieu de Mueller-Hinton normal.

a) L'association Colistine-Gentamicine

En bactériostase, nous notons une amélioration, et nous pouvons désormais considérer que l'association est du type addition.

En bactéricidie, il n'y a pas de modification apparente, mais du fait de l'augmentation de la CMB de la Gentamicine, l'antagonisme précédemment observé doit être considéré ici comme une indifférence.

b) L'association Colistine-Carbénicilline

Nous retenons une légère amélioration en bactériostase, par déplacement de la courbe vers les faibles concentrations en Colistine, de sorte que nous rangeons cette association dans celles du type addition.

Mais en bactéricidie, nous observons une aggravation des résultats, tous les tubes contenant 200 µg/ml de Carbénicilline (sauf celui qui contenait aussi 10 µg/ml de Colistine) ont laissé se développer le *Pyocyanique*. Pourtant, et à cause de l'augmentation de la CMB de la Carbénicilline, l'effet de l'association doit encore être considéré comme une indifférence.

c) L'association Gentamicine-Carbénicilline

Là aussi, si on se réfère aux nouveaux axes de CMB, les deux antibiotiques sont synergiques ; cependant, on voit que cette synergie n'est obtenue que par l'augmentation importante des CMB de chacun des constituants et que cette apparente synergie cache en fait une moins bonne sensibilité du germe ; cependant, l'utilisation de cette association serait fortement recommandable chez un urémique, alors qu'elle ne le serait pas totalement chez un malade non urémique, et atteint du même *Pyocyanique*.

On pourrait recommander, pour utilisation chez cet urémique, une association capable d'assurer dans cet organisme 0,52 µg/ml de Gentamicine et 50 µg/ml de Carbénicilline : ces doses présentent une amélioration considérable par rapport à l'utilisation isolée des deux antibiotiques, dont les CMB sont respectivement de 40 et 400 µg/ml

La considération de la figure représentant l'association Gentamicine-Carbénicilline nous permet d'insister sur le point suivant : si l'on raisonne conformément aux lois de JAWETZ, cette association ne peut être considérée comme une synergie, car la CMB de la Gentamicine n'est pas abaissée à 10 µg/ml par la présence de la Carbénicilline ; par contre, du côté de la Carbénicilline, la présence de la Gentamicine est très bénéfique, puisque la CMB de cet antibiotique est abaissée de 400 à 50 µg/ml dans l'association.

D'autre part, les concentrations de 5, 2,5, 1,25 et 0,62 µg/ml de Gentamicine, associées à 50 µg/ml de Carbénicilline, ont empêché le développement de notre souche ; ces concentrations, parfaitement atteignables en pratique, doivent permettre de classer l'association comme une synergie.

Il y a donc deux façons possibles de considérer une association : d'une part l'effet globalement mis en évidence par la représentation classique, que nous avons utilisés dans nos figures ; d'autre part, l'effet qu'il faut admettre lorsque l'on considère les différentes possibilités pratiques d'associer les antibiotiques : si l'on peut trouver un certain nombre de couples de concentrations qui permettent d'abaisser d'au moins quatre fois les CMI-CMB des antibiotiques pris séparément, alors nous devons considérer que cette association est synergique. C'est ce que nous retiendrons pour cette expérience, et que nous retrouverons pour d'autres ultérieurement.

— CMB exp n° 6
- - - CMB " témoin

FIGURE n° 5

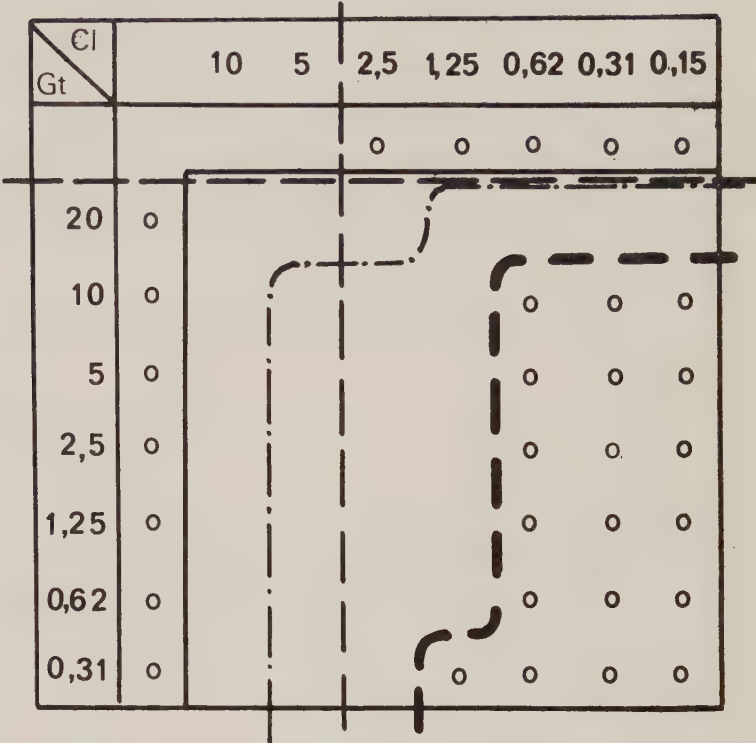
INFLUENCE DU SERUM

COLISTINE - GENTAMICINE

MILIEU : SERUM HUMAIN

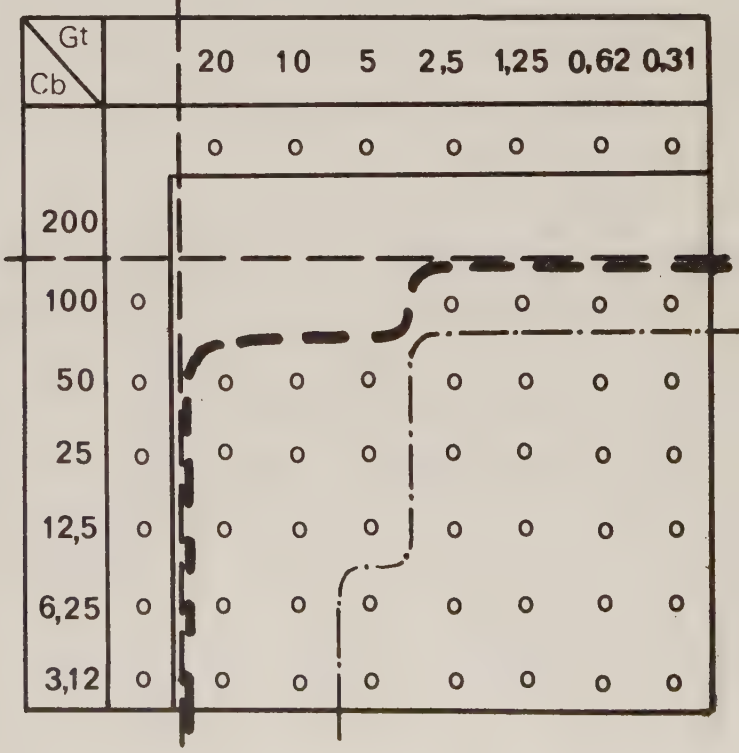
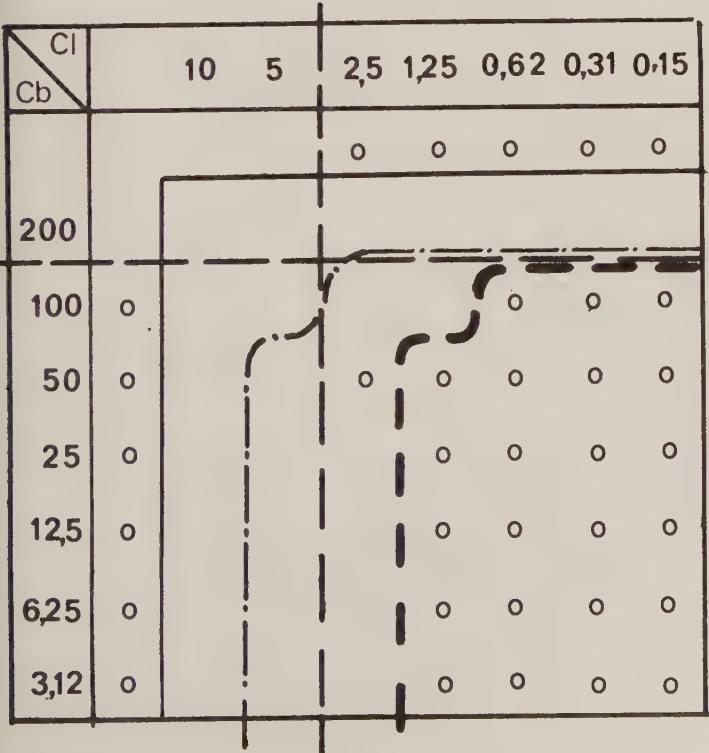
INOCULUM : dilution 1 / 100° d'une culture de 3 heures, soit 710 000 germes/ml ;

ANTIBIOTIQUES : administrés tous (µg/ml) deux avant l'en-
-semen cement bactérien.



COLISTINE - CARBENICILLINE

GENTAMICINE - CARBENICILLINE



D - L'influence du SERUM HUMAIN : Expériences n° 6, figure n° 5

Nous avons utilisé ce sérum de façon à nous rapprocher au maximum de l'utilisation en médecine des associations.

Ce sérum nous a été fourni par le Centre de Transfusion sanguine de Beynost, que nous remercions vivement : ce laboratoire nous a en effet préparé, stérilisé, et conditionné le sérum de façon parfaite.

La détermination biochimique des constituants de ce sérum a donné les résultats suivants :

urée	0,26	g/l
chlore	82	meq/l
sodium	159	meq/l
potassium	13,6	meq/l (il n'est malheureusement pas possible de maintenir un taux normal de kaliémie).
protéines	60	g/l
lipides	5,1	g/l
calcium	15	mg/l

A cause du trouble que présentait ce milieu (nous l'avons utilisé pur, sans dilution, après nous être assuré qu'il ne présentait pas de pouvoir bactéricide vis-à-vis de notre souche), il ne nous a pas été possible d'évaluer les CMI, et nous n'avons donc noté que la bactéricidie. Les CMB ont donc été les suivantes :

	CMB sur sérum	CMB sur MH normal
Colistine	5	10
Gentamicine	40	10
Carbénicilline	200	200

La souche s'est donc avérée plus résistante à la Colistine et à la Gentamicine sur ce milieu ; mais sa sensibilité à la Carbénicilline n'a pas varié.

a) L'association Colistine-Gentamicine

Nous constatons que la courbe de bactéricidie est bien en-deçà de celle que nous avons relevée sur milieu de Mueller-Hinton : elle a été fortement déplacée vers les faibles concentrations de Colistine, et nous pouvons donc considérer, d'un point de vue utilisation pratique, que le résultat est une synergie : nous pouvons en effet préconiser l'emploi de 1,25 µg/ml de Colistine avec 0,62 µg de Gentamicine.

D'un point de vue plus théorique, l'effet serait intermédiaire entre une addition et une synergie.

Remarquons que cet effet favorable est peut-être dû à l'hyper-kaliémie.

b) L'association Colistine-Carbénicilline :

Nous observons ici encore un déplacement de la courbe vers les faibles concentrations en Colistine : cet antibiotique, sur ce milieu, était incontestablement plus actif que sur milieu de Mueller-Hinton. Cette association peut ici être considérée comme une addition ; il y a progrès également.

c) L'association Gentamicine-Carbénicilline

Contrairement aux deux cas précédents, l'association est non seulement déplacée du côté des fortes concentrations (et ce surtout pour la Gentamicine), mais elle devient même du type indifférence.

Sur ce milieu, la Colistine s'est donc révélée remarquablement efficace, améliorant sensiblement le résultat des deux associations où elle rentre ; par contre, la Gentamicine et la Carbénicilline ont donné une association indifférente, à laquelle le *Pyocyanique* résiste beaucoup mieux, puisque, pour 15 µg de Gentamicine, il fallait alors 100 µg de Carbénicilline, alors que sur Mueller-Hinton, 12,5 µg de cette Pénicilline suffisaient pour assurer le non-développement de la souche dans le milieu.

FIGURE n°6

INFLUENCE DU SERUM (suite)

COLISTINE-GENTAMICINE

MILIEU: SERUM DE POULAIN

INOCULUM: dilution 1/100° d'une culture de 3 heures, soit 310 000 germes/ml;

ANTIBIOTIQUES: administrés tous (µg/ml) deux avant l'en-semencement bactérien.

Cl \ Gt		10	5	2,5	125	0,62	0,31	0,15
Gt		o	o	o	o	o	o	o
	20	o	o	o	o	o	o	o
	10	o	o	o	o	o	o	o
	5	o	o	o	o	o	o	o
	2,5	o	o	o	o	o	o	o
	125	o	o	o	o	o	o	o
	0,62	o	o	o	o	o	o	o
	0,31	o	o	o	o	o	o	o

COLISTINE - CARBENICILLINE

GENTAMICINE - CARBENICILLINE

Cl \ Cb		10	5	2,5	125	0,62	0,31	0,15
Cb		o	o	o	o	o	o	o
	200	o	o	o	o	o	o	o
	100	o	o	o	o	o	o	o
	50	o	o	o	o	o	o	o
	25	o	o	o	o	o	o	o
	12,5	o	o	o	o	o	o	o
	6,25	o	o	o	o	o	o	o
	3,12	o	o	o	o	o	o	o

Gt \ Cb		20	10	5	2,5	125	0,62	0,31
Cb		o	o	o	o	o	o	o
	200	o	o	o	o	o	o	o
	100	o	o	o	o	o	o	o
	50	o	o	o	o	o	o	o
	25	o	o	o	o	o	o	o
	12,5	o	o	o	o	o	o	o
	6,25	o	o	o	o	o	o	o
	3,12	o	o	o	o	o	o	o

E - L'influence du SERUM DE POULAIN : Expériences n° 7, figure n° 6

Nous avons effectué une série de tests sur ce milieu, car il est beaucoup plus facile de se le procurer, et il présente certains paramètres différents de ceux du sérum humain que nous avons précédemment employé.

Sa composition biochimique était la suivante :

urée	0,35	g/l
chlore	107	meq/l
sodium	136	meq/l
potassium	4,2	meq/l
protéines	69	g/l
lipides	3,4	g/l
calcium	120	mg/l

On remarque tout de suite que Colistine et Gentamicine ont des CMB qui ne rentrent pas dans ces tableaux ; par contre, la Carbénicilline est inchangée , à 200 µg/ml.

a) L'association Colistine-Gentamicine est illisible dans tous les tubes, la souche s'est développée.

b) L'association Colistine-Carbénicilline

Les contenus de deux tubes ont pu empêcher le développement de notre bacille Pyocyanique ; mais comme ce n'est pas le cas pour les cinq autres contenant 200 µg/ml de Carbénicilline, il faut classer ces antibiotiques comme antagonistes.

c) L'association Gentamicine-Carbénicilline

Vis-à-vis de la Carbénicilline, c'est une indifférence ; mais comme nous n'avons pas pu évaluer la CMB de la Gentamicine, il est difficile de classer cette association.

Les résultats de cette série d'expériences sont à rapprocher :

1) de ceux des expériences où nous avons rajouté du calcium au Mueller-Hinton : en effet ici, nous sommes intermédiaires entre 23 et 153 mg/l : on observe bien l'augmentation de la résistance à la Colistine et à la Gentamicine, mais pas encore celle à la Carbénicilline.

	CMI	exp	n° 8
	CMB	"	"
	CMI	"	témoin
	CMB	"	"

FIGURE n°7

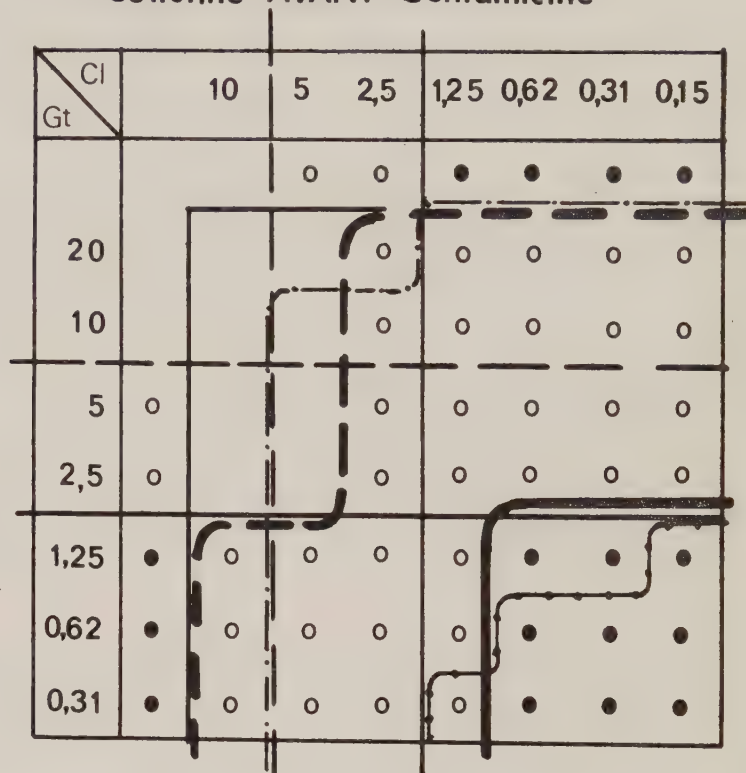
ADMINISTRATION DIFFEREE DE L' UN DES ANTIBIOTIQUES

MILIEU: Mueller - Hinton normal

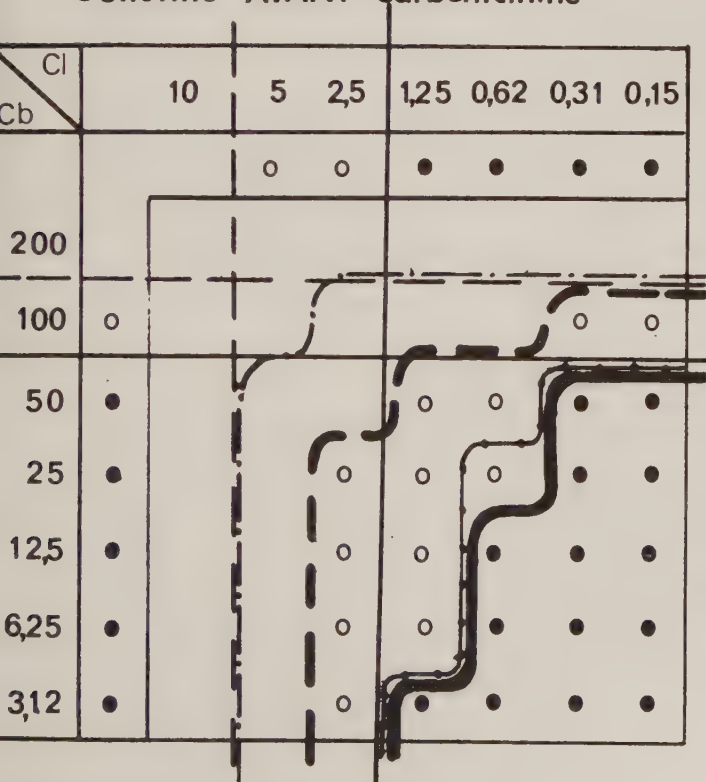
INOCULUM: dilution 1/100° d'une culture de 3 heures, soit 700 000 germes/ml,

ANTIBIOTIQUES: le second antibiotique est administré 3 heures après le premier

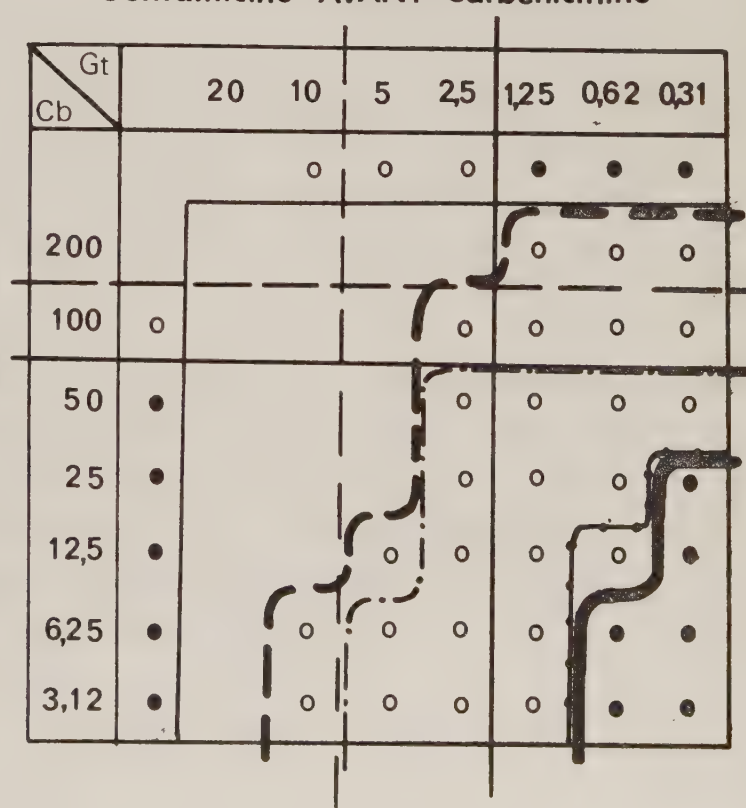
Colistine AVANT Gentamicine



Colistine AVANT Carbénicilline



Gentamicine AVANT Carbénicilline



2) LES DEUX ANTIBIOTIQUES SONT ADMINISTRES A DES TEMPS DIFFERENTS

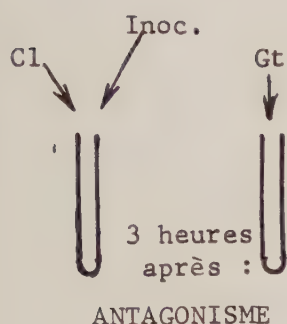
a) SEPARATION DE TROIS HEURES

Expériences n° 8 , figure n° 7 : dans toutes ces expériences, nous avons utilisé du milieu de Mueller-Hinton normal, c'est-à-dire que nous n'avons plus fait varier la composition du milieu d'étude, mais seulement la répartition dans le temps des antibiotiques.

L'association Colistine-Gentamicine : La Colistine a été répartie la première, puis l'inoculum bactérien : nous plaçons alors à

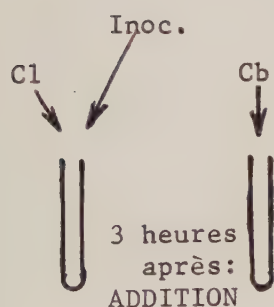
l'étuve pendant 3 heures, puis nous répartissons la Gentamicine.

L'examen des courbes ne montre que peu de modifications par rapport à celles que nous avons obtenues lors de l'administration simultanée : nous retiendrons donc une indifférence en bactériostase, et un antagonisme en bactéricidie.



L'association Colistine-Carbénicilline : la Colistine a été mise à incuber avec l'inoculum trois heures avant la Carbénicilline : nous

n'observons pas de modifications en bactériostase , l'effet demeure une addition, ou un état intermédiaire entre une indifférence et une addition ; mais en bactéricidie, il y a un déplacement de la courbe vers les faibles concentrations en Colistine ; alors que dans l'expérience témoin nous avons retenu une indifférence, c'est ici une addition . Nous pourrions recomman-

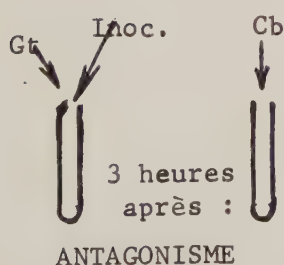


der l'emploi de 2,5 µg/ml de Colistine, et de 50 µg/ml de Carbénicilline 3 heures après .

L'association Gentamicine-Carbénicilline : la Gentamicine

a été administrée trois heures avant la Carbénicilline. Nous n'avons pas

noté de modifications en bactériostase, où ces antibiotiques restent additifs ; mais en bactéricidie, ils sont devenus antagonistes, au maximum on peut admettre qu'ils sont indifférents.



On voit donc, sur cette première série d'essais, que le fait de DECALER l'administration des constituants d'une association peut modifier le caractère de celle-ci. Cela va être confirmé par les résultats suivants.

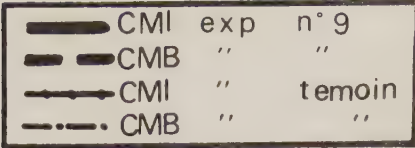


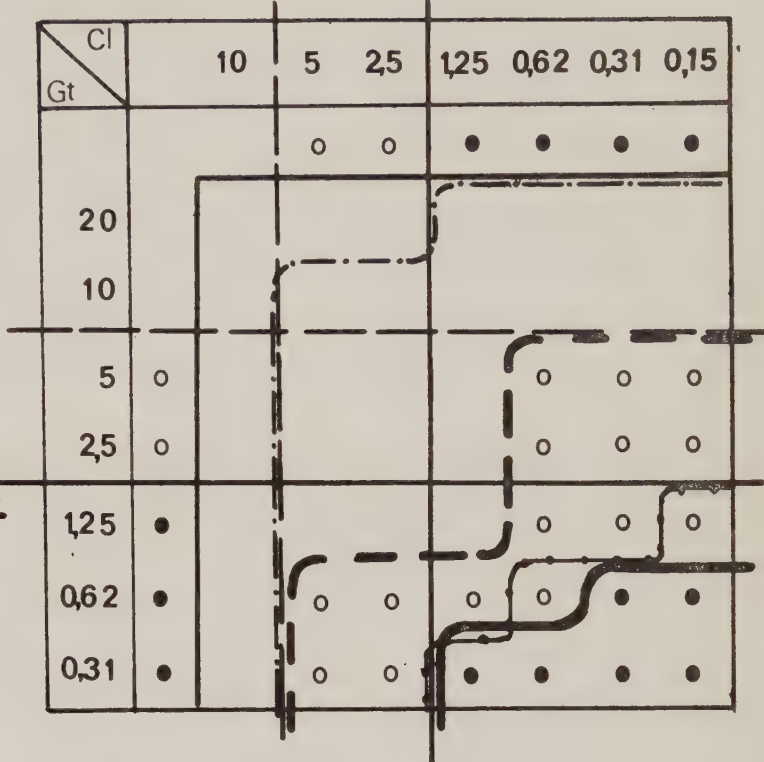
FIGURE n°8
ADMINISTRATION DIFFEREE DE L'UN DES ANTIBIOTIQUES(II)

Colistine APRES Gentamicine

MILIEU: Mueller - Hinton normal;

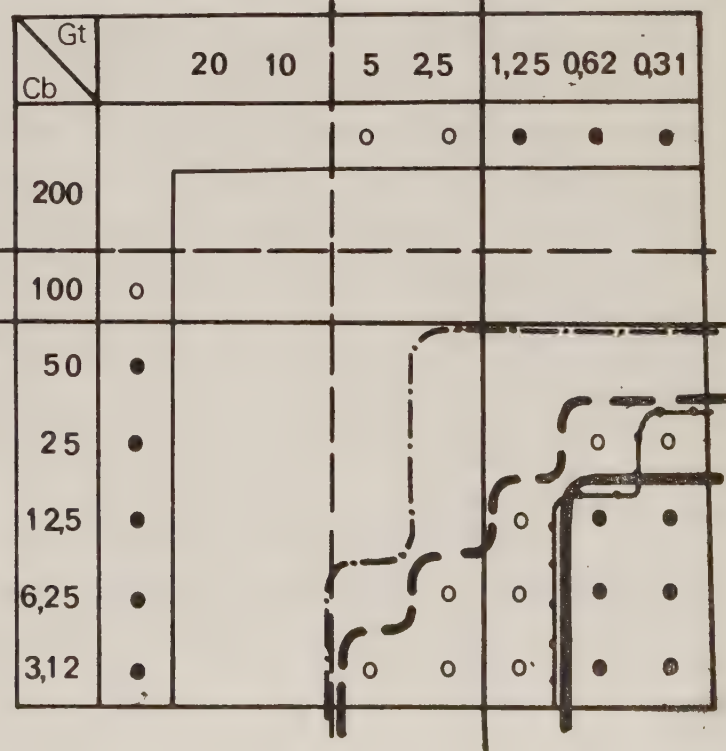
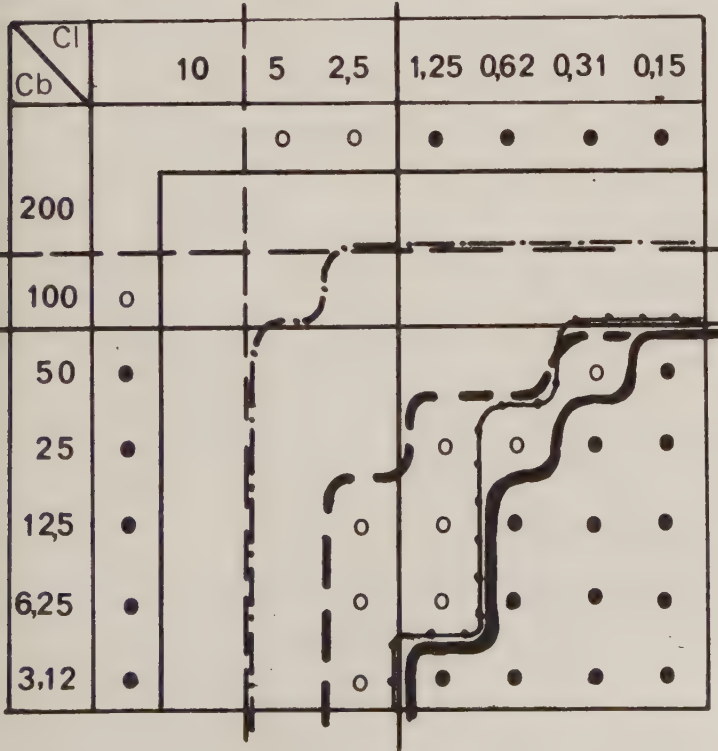
INOCULUM: dilution 1/100° d'une culture de 3 heures, soit 290 000 germes/ml;

ANTIBIOTIQUES: séparés de 3 heures (μ g/ml)



Colistine APRES Carbénicilline

Gentamicine APRES Carbénicilline

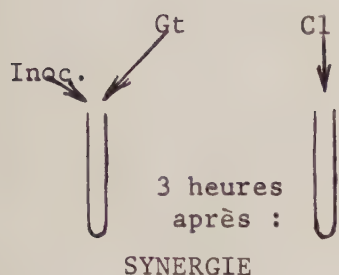


Expériences n° 9 , figure n° 8 : l'ordre a été inversé.

L'association Colistine-Gentamicine : Nous avons cette fois mis à incuber la Gentamicine en présence de l'inoculum, et trois heures après, nous avons rajouté la Colistine.

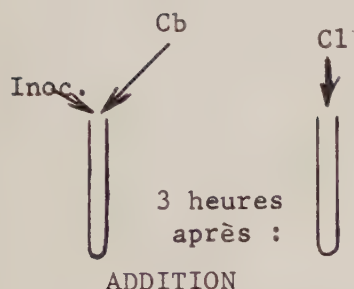
Nous pouvons constater une légère amélioration en bactériostase, l'effet devenant une addition ; mais c'est surtout en bactéricidie

que l'amélioration est nette : la courbe est très décalée vers les basses concentrations pour les deux antibiotiques : il faut ranger cette association dans les synergies : on peut assurer une bactéricidie avec seulement 1,25 µg/ml de Colistine donné 3 heures APRES 1,25 µg/ml de Gentamicine.



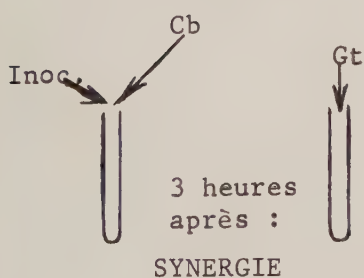
L'association Colistine-Carbénicilline : la Colistine a été introduite 3 heures après la Carbénicilline : globalement, nous n'observons pas de modification en bactériostase : ces antibiotiques restent indifférents.

En bactéricidie , la courbe est elle aussi déplacée vers la droite : nous obtenons une addition, presque une synergie. Nous pouvons préconiser 0,62 µg/ml de Colistine 3 heures après 50 µg/ml de Carbénicilline.



L'association Gentamicine-Carbénicilline : la Gentamicine a été introduite 3 heures APRES la Carbénicilline : en bactériostase, l'effet est intermédiaire entre une addition et une synergie ; en bactéricidie,

nous avons cette fois une synergie : on peut donner 1,25 µg/ml de Gentamicine 3 heures après 25 µg/ml de Carbénicilline, ou même 0,31 µg de Gentamicine 3 heures après 50 µg/ml de Carbénicilline.



Nous pouvons donc conclure de cette série d'expériences :

1) que l'addition du deuxième antibiotique 3 heures après incubation de notre souche en présence du premier peut changer le résultat de l'association estimée lorsqu'ils sont administrés en même temps ;

2) que ce changement peut être extrêmement important : l'association Colistine-Gentamicine, antagoniste lorsque les deux antibiotiques sont mis simultanément, est synergique lorsque la Colistine est introduite 3 heures après la Gentamicine ;

3) que l'ordre d'introduction peut être primordial :

a) dans Colistine-Gentamicine, il faut donner la Colistine après la Gentamicine,

b) dans Colistine-Carbénicilline, on a une addition dans les deux cas, mais il est préférable là aussi que la Colistine soit introduite 3 heures après la Carbénicilline ;

c) dans Gentamicine-Carbénicilline, il faut que la Gentamicine soit introduite après la Carbénicilline, pour que l'on observe la synergie ; si l'on fait l'inverse, on a au minimum une indifférence, si ce n'est un antagonisme.

Pourquoi la Colistine agit-elle mieux quand elle est administrée après la Gentamicine ? Cela paraît difficile à expliquer, quand on sait que les Polymyxines agissent sur les bactéries en détruisant leur membrane. Peut-être la Gentamicine sélectionne-t-elle une catégorie de mutants qui lui sont résistants, mais dont les constituants lipidiques de la membrane sont sensibles à la Colistine.

D'un autre côté, le fait que la Gentamicine agisse bien 3 heures après la Carbénicilline paraîtrait plus facile à expliquer : la Carbénicilline, active sur la paroi bactérienne, permettrait un passage plus facile de la Gentamicine, qui doit pénétrer dans la bactérie pour exercer son action anti-synthèse protéique.

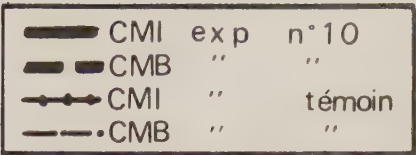


FIGURE n° 9

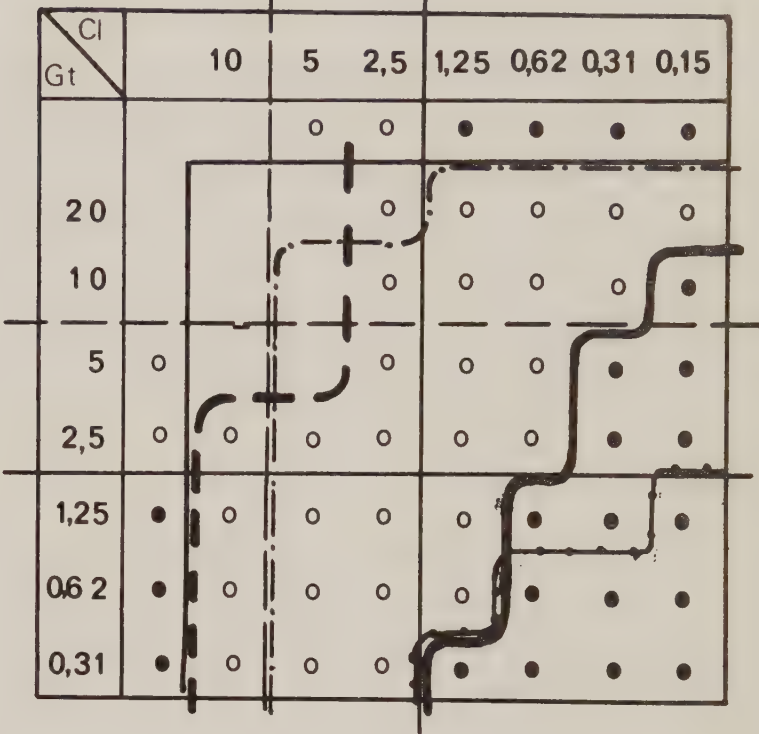
ADMINISTRATION DIFFEREE DE L'UN DES ANTIBIOTIQUES(III)

MILIEU: Mueller - Hinton normal ;

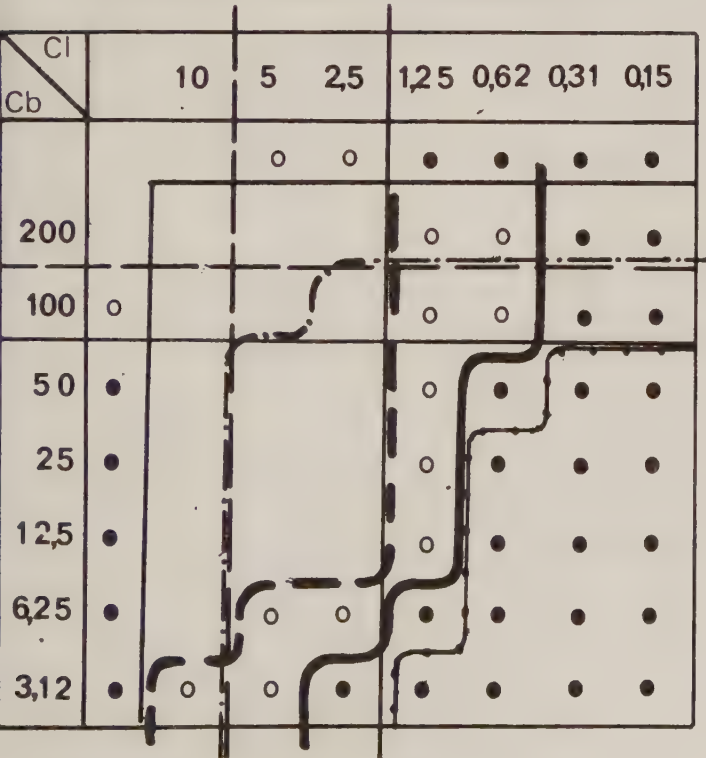
INOCULUM: dilution 1/100° d'une culture de 3 heures, soit 420 000 germes/ml ;

ANTIBIOTIQUES: le second est (µg/ml) administré ici 6 heures après l'ensemencement bactérien.

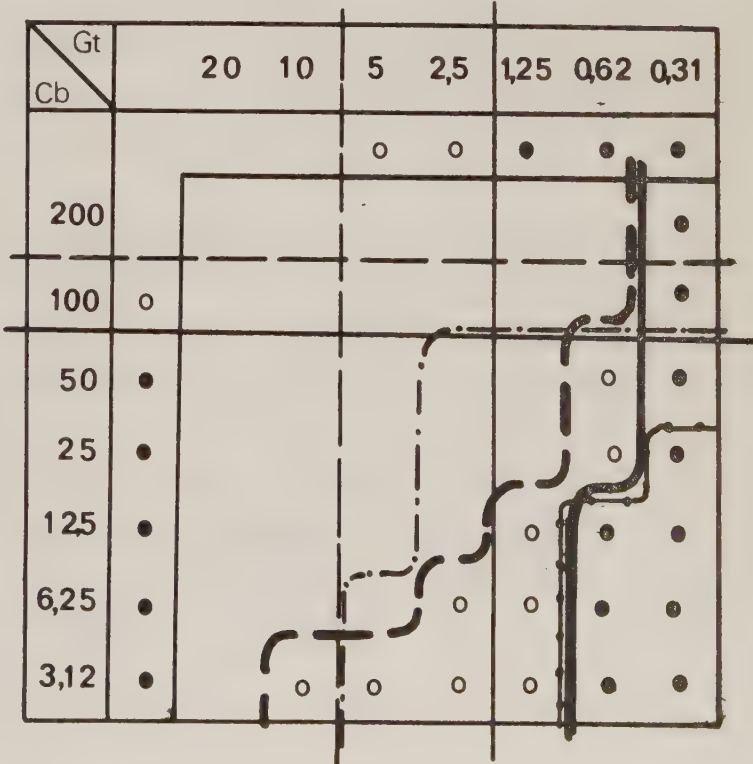
Colistine AVANT Gentamicine



Colistine AVANT Carbénicilline



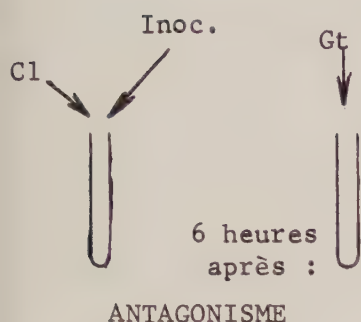
Gentamicine AVANT Carbénicilline



b) SEPARATION DE SIX HEURES

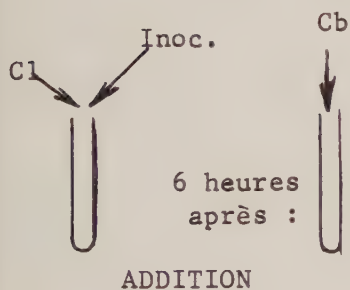
Expérience n° 10 , figure n° 9.

L'association Colistine-Gentamicine : Nous avons mis à incuber la Colistine avec l'inoculum, et nous avons rajouté 6 heures plus tard la Gentamicine.



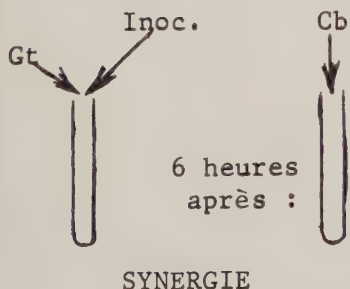
En bactériostase, nous observons un antagonisme, lorsque sont en présence de faibles concentrations de Colistine et de fortes concentrations de Gentamicine : il y a un déplacement de la courbe vers les fortes concentrations en Gentamicine ; en bactéricidie, on a en plus un déplacement vers la gauche. Au total, ces deux antibiotiques sont donc nettement antagonistes lorsqu'ils sont utilisés de cette façon.

L'association Colistine-Carbénicilline : comparées aux courbes que nous avons obtenues lors de l'administration simultanée des antibiotiques, les courbes sont ici décalées globalement vers le haut ;



c'est une addition ; néanmoins, on peut admettre une synergie pour les concentrations moyennes en bactéricidie : cela confirme parfaitement ce que nous mentionnions plus haut concernant la façon de juger de l'action d'une association . Nous pouvons assurer une bactéricidie avec 2,5 µg/ml de Colistine et 12,5 µg/ml de Carbénicilline donnés 6 heures après.

L'association Gentamicine-Carbénicilline : la Carbénicilline est introduite 6 heures après la Gentamicine : en bactériostase, la courbe est comparable à la courbe-témoin, mis à part les tubes qui ne contiennent



que 0,31 µg/ml de Gentamicine : nous retrouvons donc une addition.

En bactéricidie, nous notons une amélioration, et nous pouvons admettre une synergie, associant par exemple 1,25 µg/ml de Gentamicine et 25 µg/ml de Carbénicilline 6 heures plus tard.

Dans ces trois associations, les courbes sont décalées vers le haut : pendant 6 heures, le Pyocyanique n'est en présence que d'un antibiotique, celui qui est placé horizontalement sur les graphiques, de sorte que même des concentrations élevées du second antibiotique ne peuvent pas détruire les germes contenus dans les tubes où il y avait de faibles concentrations du premier, et où il y avait sans doute une culture plus apparente.

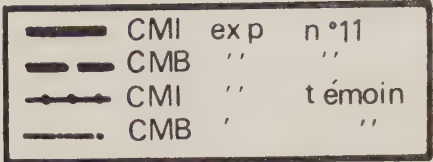


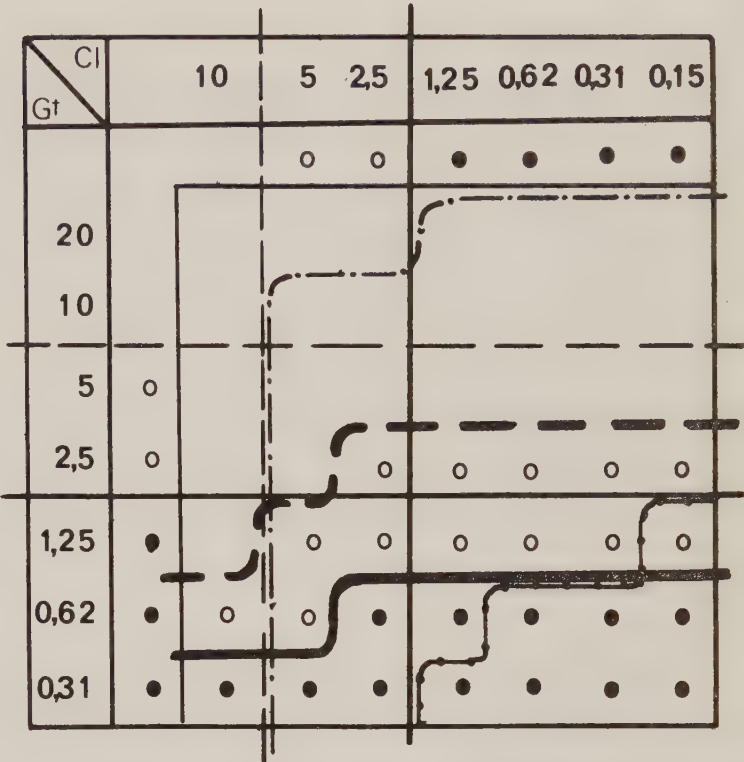
FIGURE n°10
ADMINISTRATION DIFFEREE DE L'UN DES ANTIBIOTIQUES(IV)

MILIEU : Mueller - Hinton normal

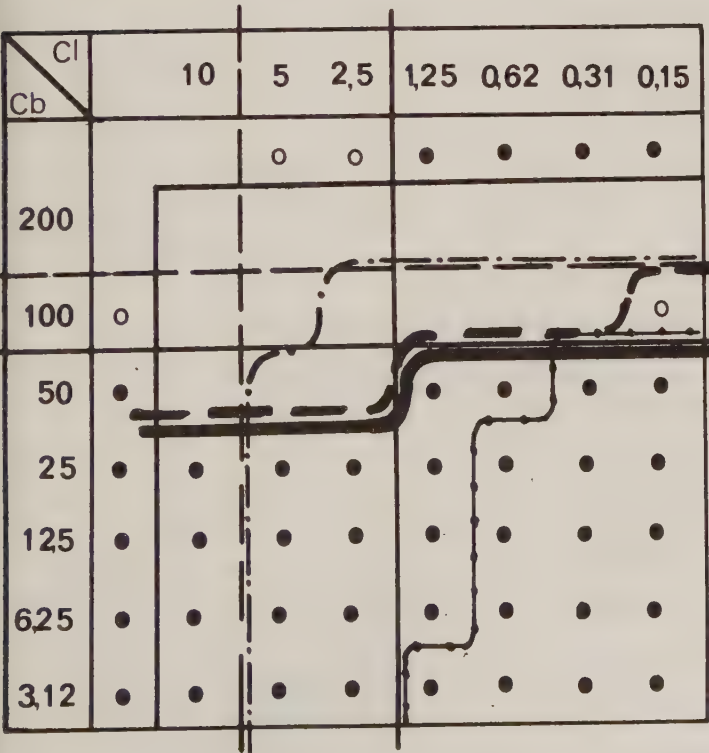
INOCULUM : dilution 1/100° d'une culture de 3 heures
soit 310 000 germes/ml

ANTIBIOTIQUES : séparés de 6 heures
(µg/ml)

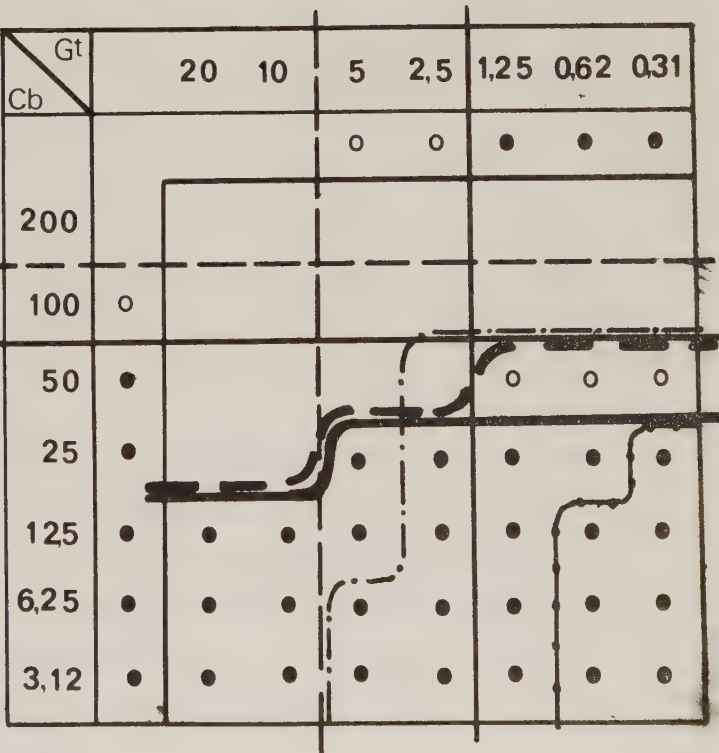
Colistine APRES Gentamicine



Colistine APRES Carbénicilline



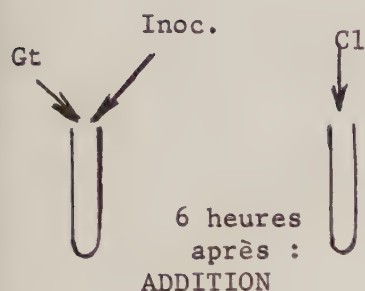
Gentamicine APRES Carbénicilline



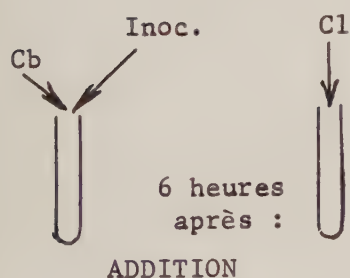
Expérience n° 11, figure n° 10 : les antibiotiques sont répartis dans l'ordre inverse.

Alors que dans le groupe précédent d'associations, les courbes étaient déplacées vers le haut et vers la droite, elles le sont cette fois vers le bas et la gauche.

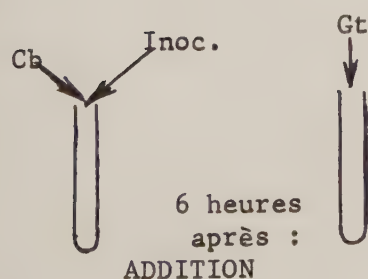
- L'association Colistine-Gentamicine : la Colistine est introduite 6 heures après la Gentamicine. En bactériostase, on peut considérer que l'on a une addition à cause des tubes contenant $1,25 \mu\text{g/ml}$ de Gentamicine : cette concentration suffit en effet à assurer la bactériostase : pourtant, et à cause des faibles concentrations en cet antibiotique, l'action est celle d'un antagonisme. Pour la bactéricidie, on peut retenir une addition, mais la combinaison qui serait envisageable ($5 \mu\text{g/ml}$ de Colistine et $2,5 \mu\text{g/ml}$ de Gentamicine) n'est pas intéressante.



- L'association Colistine-Carbénicilline : la Carbénicilline est administrée 6 heures après la Colistine : en bactériostase, l'antagonisme est particulièrement net ; mais nous pouvons remarquer qu'en bactéricidie, la courbe est très peu différente de celle que l'on a en bactériostase : on observe ainsi une addition . On peut assurer cette bactéricidie avec $2,5 \mu\text{g/ml}$ de Colistine donnée 6 heures après $50 \mu\text{g/ml}$ de Carbénicilline.



- L'association Gentamicine-Carbénicilline : la Gentamicine est introduite 6 heures après la Carbénicilline : nous constatons, comme dans l'association précédente, que les courbes de bactériostase et de bactéricidie sont très peu différentes.



En bactériostase, nous avons une addition si nous tenons compte des tubes qui contiennent $5 \mu\text{g/ml}$ de Gentamicine, et où aucune culture n'a été mise en évidence ; mais tous les tubes contenant moins de $25 \mu\text{g/ml}$ de Carbénicilline ayant laissé le Pyocyanique se développer, il faudrait ranger l'association du côté des antagonismes..

En bactéricidie par contre, on peut plus facilement admettre l'addition . De toute manière, l'effet est très comparable à ce qui avait été obtenu lorsque l'ordre était inverse.

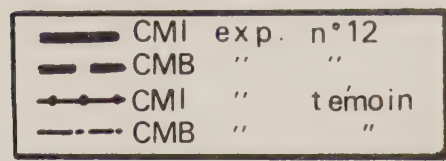
Donc, pour un temps de séparation de SIX heures, il faut mettre :

1) la Colistine après la Gentamicine: cela confirme ce qui avait été obtenu avec trois heures,

2) la Colistine avant ou après la Carbénicilline ; comme il vaut mieux pratiquement mettre plus de Carbénicilline et moins de Colistine, l'ordre plus avantageux serait Colistine après Carbénicilline,

3) la Gentamicine AVANT la Carbénicilline : ce résultat est l'opposé de ce que nous avons trouvé pour 3 heures, et paraît difficilement explicable.

FIGURE n°II
INFLUENCE DE L' INOCULUM(I)

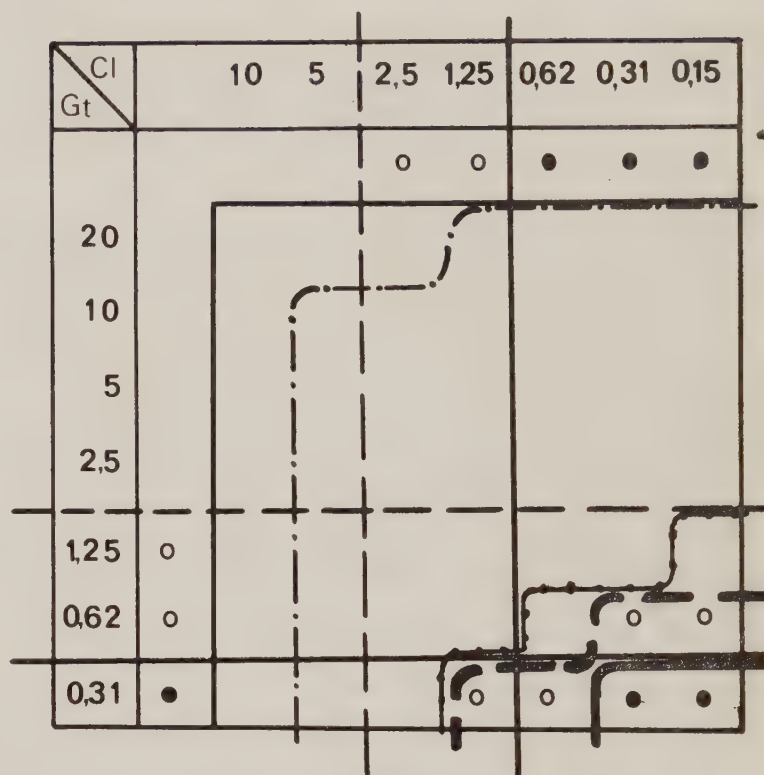


MILIEU: Mueller - Hinton normal

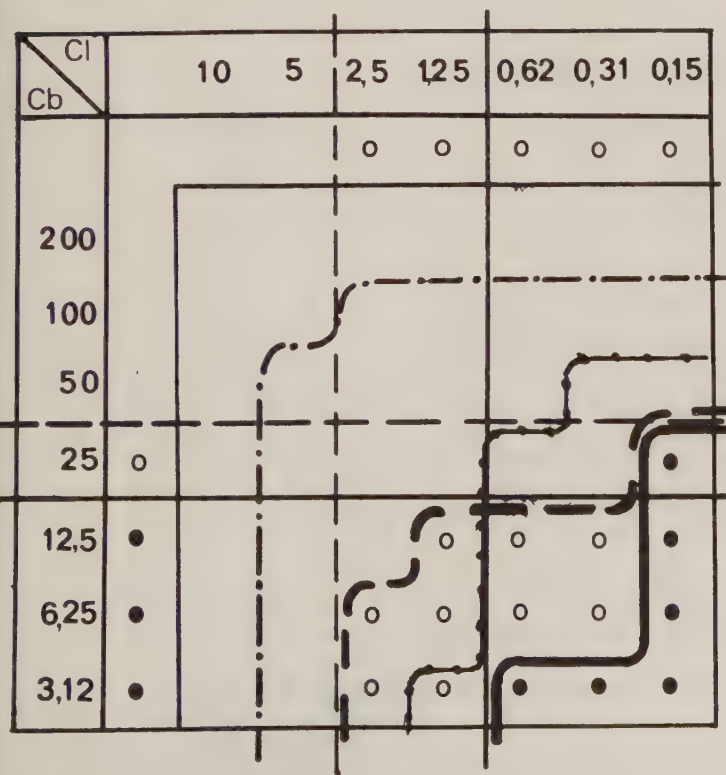
INOCULUM: Jeune (3 heures),
mais FAIBLE:
270 germes/ml ;

ANTIBIOTIQUES : administrés tous
(μ g/ml) deux avant l'en-
-semencement bactérien.

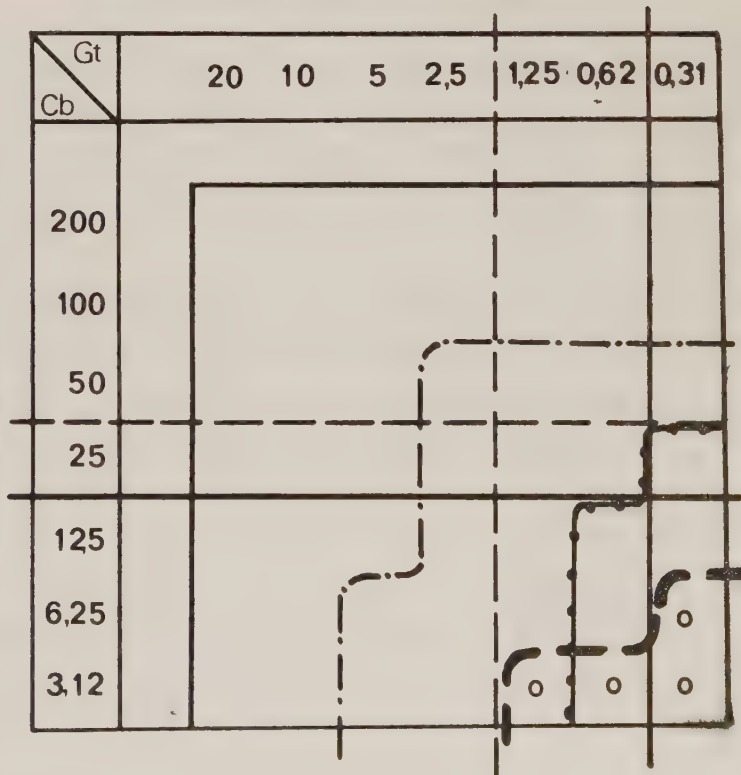
COLISTINE - GENTAMICINE



COLISTINE - CARBENICILLINE



GENTAMICINE - CARBENICILLINE



3- L'INOCULUM

A - L'IMPORTANCE de l'inoculum

1) Inoculum très faible : Expériences n° 13, figure 11.

Nous avons utilisé un inoculum contenant seulement 270 germes/ml. Les CMI et CMB des antibiotiques ont été abaissées :

	CMI (μ g)		CMB (μ g)	
	Inoc. faible	Inoc. normal	Inoc. faible	Inoc. normal
Colistine	1,25	2,5	5	10
Gentamicine	0,62	2,5	2,5	10
Carbénicilline	25	100	50	200

L'association Colistine-Gentamicine : nous retenons une indifférence en bactériostase ; mais en bactéricidie, la synergie est très nette : ce résultat est très différent de ce que nous avons noté avec l'inoculum normal (antagonisme).

L'association Colistine-Carbénicilline : en bactériostase, nous avons aussi une amélioration , puisque d'une indifférence, l'association est passée à une addition ; en bactéricidie, l'action relève encore d'une indifférence, à la rigueur d'une addition.

L'association Gentamicine-Carbénicilline : aucun tube n'a montré de culture visible après 24 heures d'incubation : en bactériostase, l'effet est donc une synergie. En bactéricidie, nous retenons une synergie! 0,62 μ g/ml de Gentamicine et 6,25 μ g/ml de Carbénicilline sont suffisants pour garantir cette bactéricidie.

Un inoculum faible favorise donc nos associations, puisque deux sur trois se révèlent synergiques, alors qu'une association (Colistine-Gentamicine) groupait deux antibiotiques antagonistes dans l'expérience de référence.

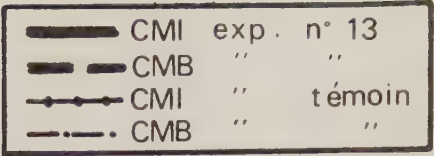


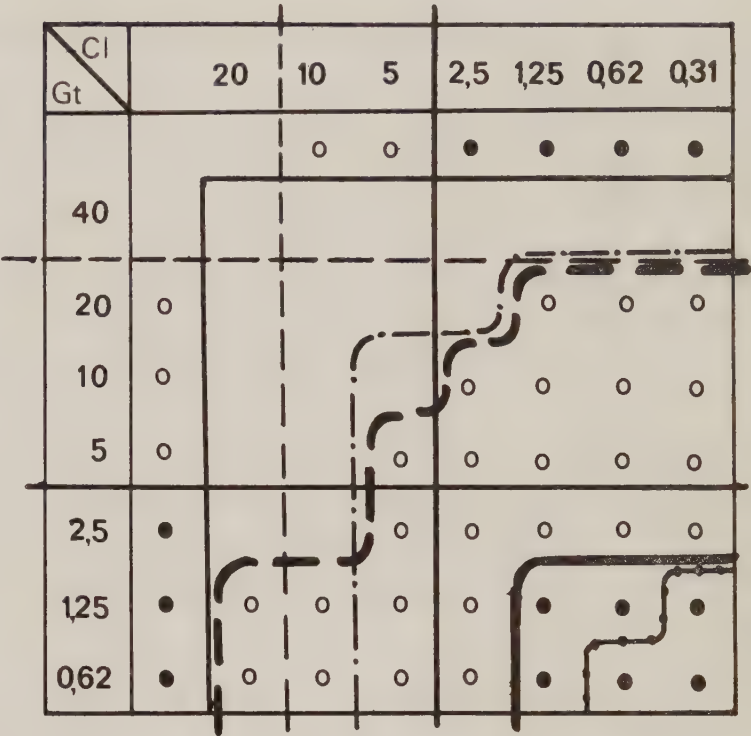
FIGURE n° 12
INFLUENCE DE L' INOCULUM (11)

COLISTINE - GENTAMICINE

MILIEU : Mueller-Hinton normal

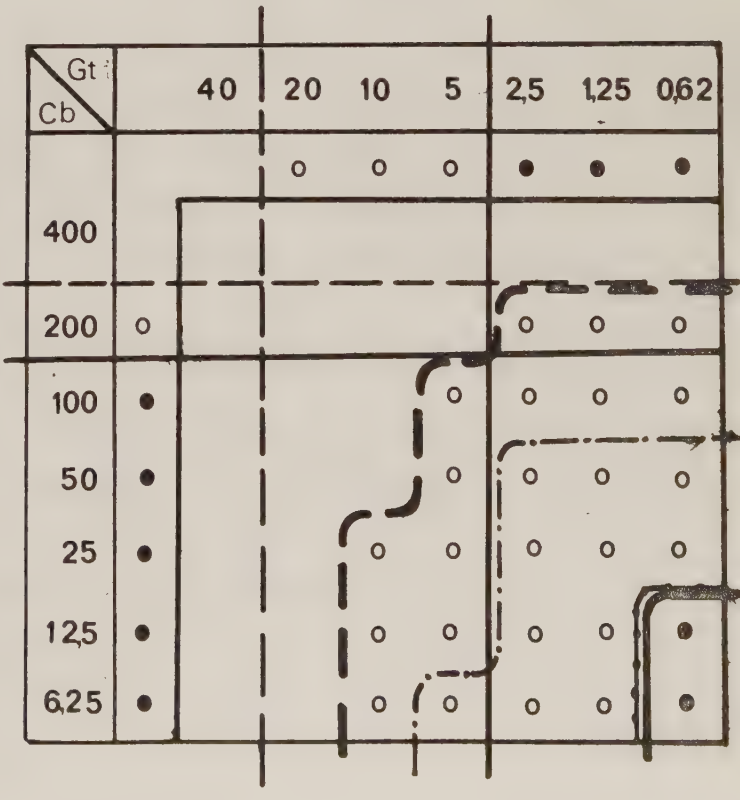
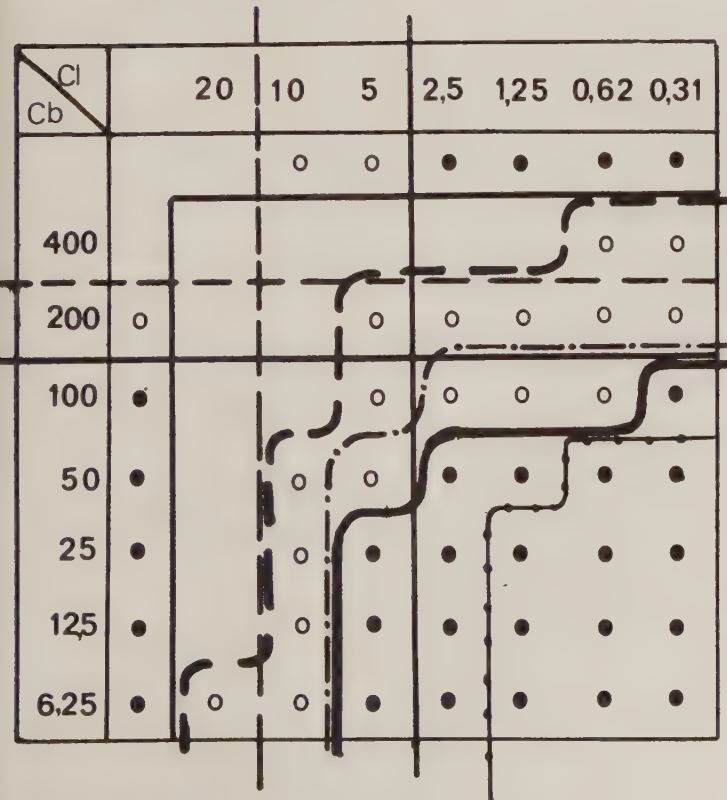
INOCULUM : jeune, mais LOURD :
9.000.000 germes/ml ;

ANTIBIOTIQUES : administrés tous
(μ g/ml) deux avant l' en-
-semencement bactérien.



COLISTINE - CARBENICILLINE

GENTAMICINE - CARBENICILLINE



2) Inoculum LOURD : Expériences n° 13 , figure n° 12

Nous avons utilisé ici un inoculum de $9 \cdot 10^6$ germes/ml. Là aussi, il s'agissait de germes en phase de croissance. Cette fois, les CMI et CMB des antibiotiques ont été augmentées.

	CMI		CMB	
	Inoc. lourd	Inoc. normal	Inoc. lourd	Inoc. normal
Colistine	5	2,5	20	10
Gentamicine	5	2,5	40	10
Carbénicilline	200	100	400	200

L'association Colistine-Gentamicine : en bactériostase, nous observons une addition, qui est due à une augmentation des CMI isolées ; nous relevons également une addition en bactéricidie : ces résultats sont donc eux aussi meilleurs que ceux obtenus avec un inoculum normal.

L'association Colistine-Carbénicilline : en bactériostase, l'effet est une indifférence ; en bactéricidie, la courbe est déplacée vers les fortes concentrations, mais l'effet demeure néanmoins celui d'une indifférence.

L'association Gentamicine-Carbénicilline : en bactériostase, la courbe est superposable à celle obtenue avec le témoin, mais, du fait de l'augmentation des CMI isolées des antibiotiques, l'action est cette fois une synergie ; en bactéricidie, on a une addition, presque une synergie.

L'influence de l'importance de l'inoculum se révèle donc déterminante :

1) pour les CMI-CMB des associations, dont le caractère est différent selon qu'elles sont en présence des inoculums extrêmes ou de l'inoculum normal ;

2) et pour les CMI-CMB de chacun des antibiotiques isolés.

FIGURE n° 13
INFLUENCE DE L'AGE DE L' INOCULUM

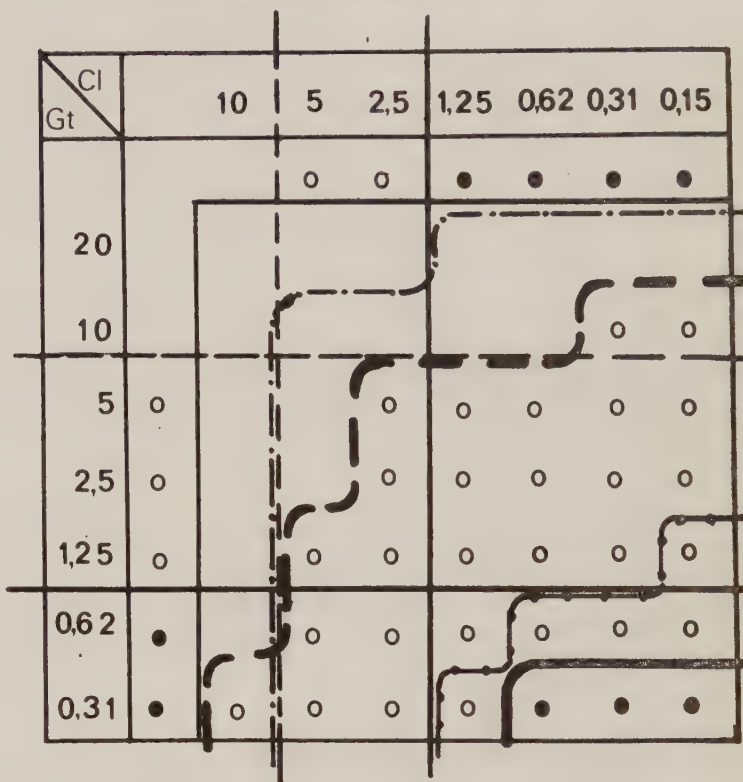
—	CMI	exp	n°14
- - -	CMB	"	"
—●—	CMI	"	témo i n
- - -●-	CMB	"	"

MILIEU: Mueller Hinton normal

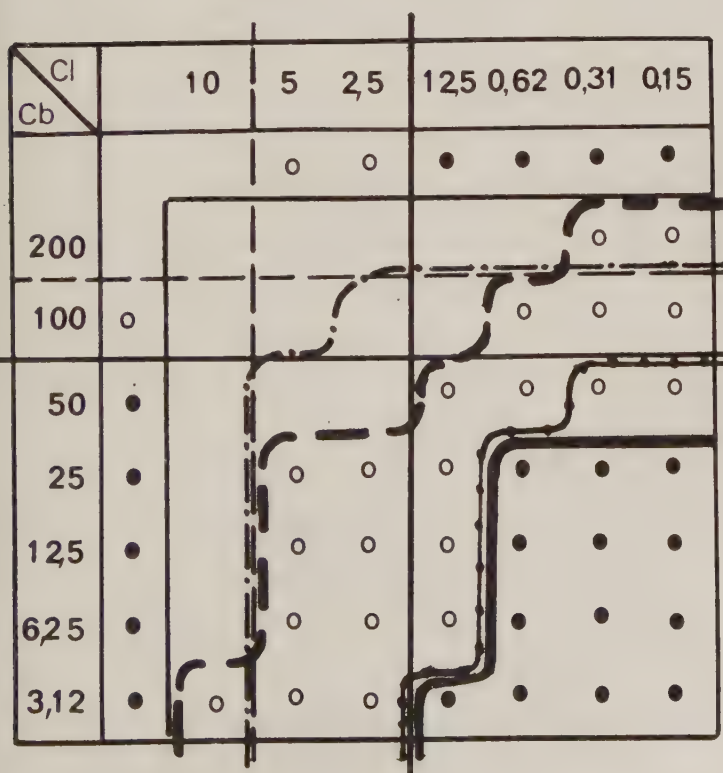
INOCULUM: AGE de 24 heures,
270 000 germes/ml;

ANTIBIOTIQUES: administrés tous
(μ g/ml) deux avant l'en-
- semencement bactérien

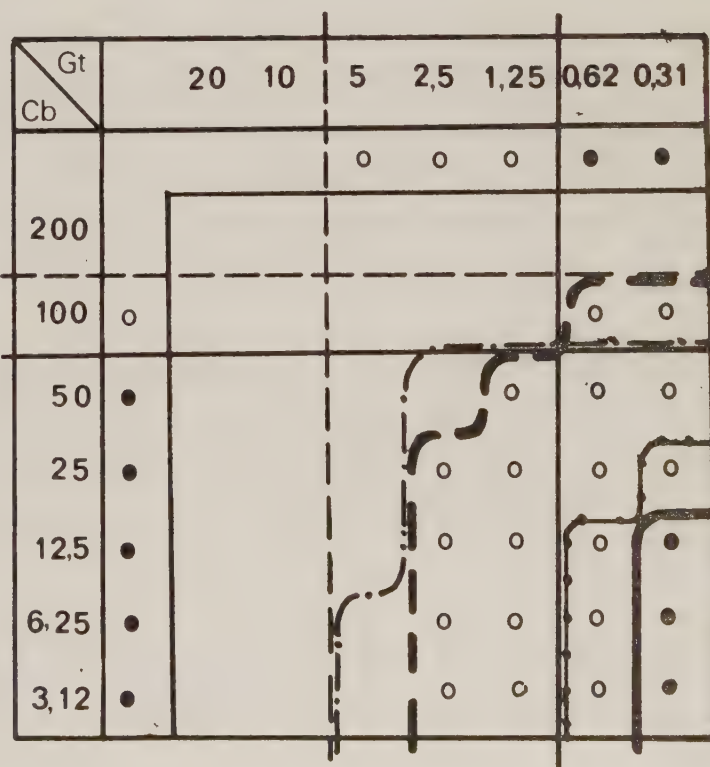
COLISTINE_GENTAMICINE



COLISTINE_CARBENICILLINE



GENTAMICINE_CARBENICILLINE



B - L'AGE de l'inoculum :Expériences n° 14, figure n° 13.

Dans tous les tests que nous avons effectués jusqu'alors, nous avons utilisé une culture de trois heures, donc jeune, Il était intéressant de voir ce que donneraient les associations sur une culture âgée : nous avons donc pris une culture de 24 heures.

La numération a révélé 270 000 germes/ml.

Les CMI et CMB des antibiotiques isolés ont été les suivantes:

	CMI		CMB	
	Inoc. âgé	Inoc. normal	Inoc. âgé	Inoc. normal
Colistine	2,5	2,5	10	10
Gentamicine	1,25	2,5	10	10
Carbénicilline	100	100	200	200

Nous voyons donc que la sensibilité de notre souche est pratiquement identique à ce qu'elle était lorsque nous la prenions en phase de croissance (âgée de 3 heures).

L'association Colistine-Gentamicine : en bactériostase, la courbe que nous obtenons traduit une action meilleure que celle de l'expérience témoin ; elle témoigne d'une addition ; en bactéricidie, l'action est également meilleure, car nous avons cette fois une indifférence, remplaçant l'antagonisme.

L'association Colistine-Carbénicilline : en bactériostase, la courbe subit peu de changements, mais elle montre cependant une addition ; en bactéricidie, on retiendra l'indifférence. Pourtant, cette bactéricidie peut être obtenue avec 2,5 µg/ml de Colistine et 50 µg/ml de Carbénicilline.

L'association Gentamicine-Carbénicilline : il y a une synergie en bactériostase, mais seulement une addition en bactéricidie ; nous

retrouvons sensiblement les mêmes courbes de bactéricidie, que l'inoculum soit jeune ou âgé.

Ces résultats sont donc quelque peu surprenants, car nous pensions que l'état de la multiplication de la souche pouvait influencer sa sensibilité aux antibiotiques et à leurs associations. En fait, la seule, parmi ces associations, qui ait été modifiée est Colistine-Gentamicine où ces deux antibiotiques deviennent additifs, alors qu'ils étaient antagonistes lorsque le Pyocyanique était pris en phase de multiplication intense.

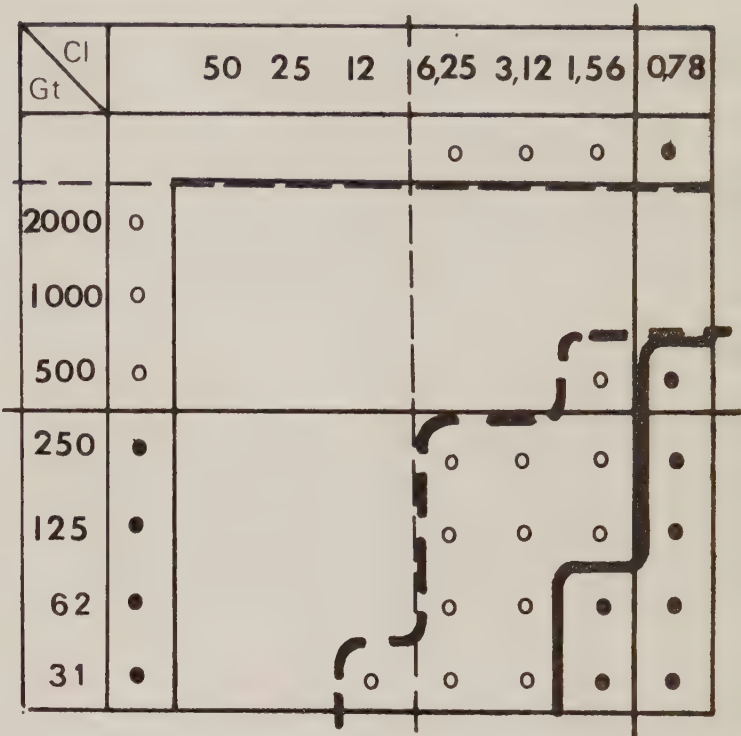
FIGURE n°14
UNE SOUCHE TRES RESISTANTE

MILIEU : Mueller-Hinton normal

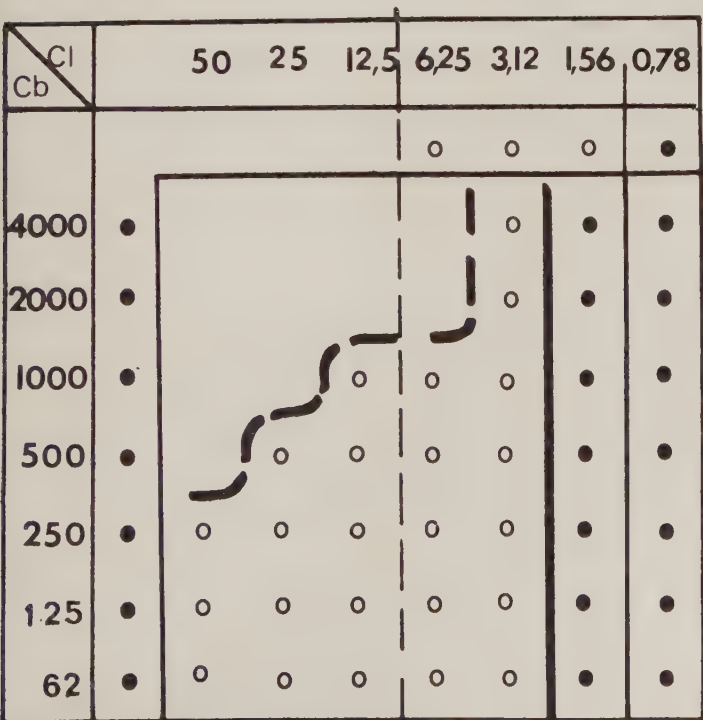
INOCULUM: dilution 1/100° d'une
culture de 3 heures,
soit 250 000 germes/ml;

ANTIBIOTIQUES : administrés tous
(μ g/ml) deux avant l'ensemencement bactérien.

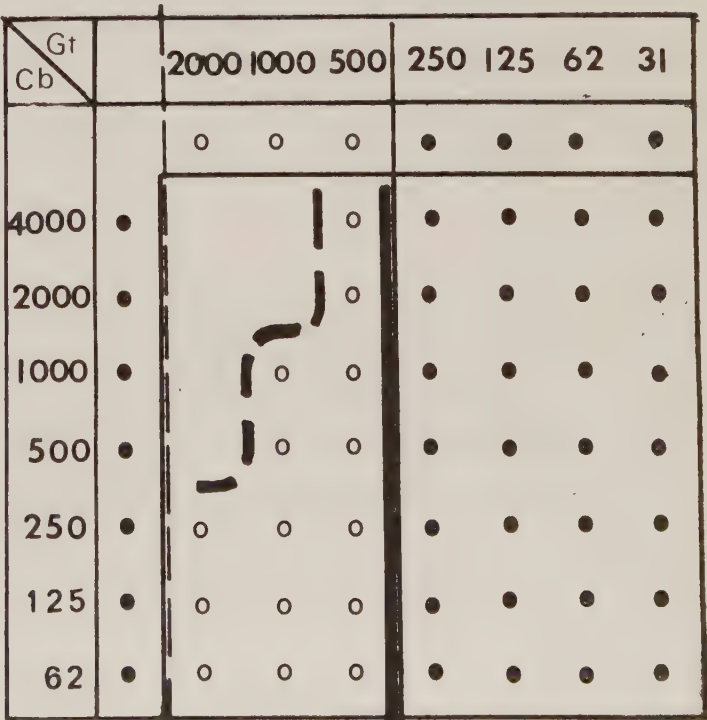
COLISTINE_GENTAMICINE



COLISTINE-CARBENICILLINE



GENTAMICINE-CARBENICILLINE



3) LES TROIS ASSOCIATIONS ET UNE SOUCHE TRES RESISTANTE

Expériences n° 15, figure n° 14.

Cette souche s'est révélée redoutable : nous avons en effet trouvé les résultats suivants :

	CMI	CMB
Colistine	1,56	12,5
Gentamicine	500	2000
Carbénicilline	> 4000	> 4000

C'est pour cela que nous avons essayé nos associations sur cette souche, dans l'espoir d'en trouver une qui soit capable d'inhiber son développement.

L'association Colistine-Gentamicine : ces deux antibiotiques sont antagonistes en bactériostase , mais ils sont synergiques en bactéricidie ; la plus faible dose de Gentamicine que l'on puisse employer dans l'association est cependant de 500 µg/ml, dose qu'il est impossible d'atteindre in vivo.

L'association Colistine-Carbénicilline : il a été impossible de voir comment agissait la Carbénicilline sur cette souche, tant celle-ci lui était résistante. Néanmoins, la colonne de tubes situés à gauche de la CMI de la Colistine indique un antagonisme en bactériostase pour toutes les concentrations de Carbénicilline. Il en est de même en bactéricidie, avec tous les tubes du quadrant inférieur gauche. Avec 6,25 µg/ml de Colistine, il faut 2000 µg/ml de Carbénicilline pour empêcher le développement de cette souche.

L'association Gentamicine-Carbénicilline : en bactériostase, ces antibiotiques semblent rigoureusement indifférents. En bactéricidie, sur la faible partie de la courbe qui nous est visible, l'effet serait celui d'une addition, mais les taux nécessaires pour que l'on puisse espérer une telle action sont tout à fait impossibles à atteindre en pratique.

Cette souche exceptionnelle permet de constater que, en présence d'un tel germe, la thérapeutique par association est illusoire : en effet, si Colistine-Gentamicine et Gentamicine-Carbénicilline se révèlent synergiques, il n'est pas question d'atteindre des taux sériques aussi extraordinaires : la Colistine n'est synergique avec la Gentamicine qu'à partir de 500 µg de cette dernière, dose parfaitement hors d'atteinte du clinicien; de même, 6,25 µg de Colistine nécessiteraient 1000 µg de Carbénicilline : cette dose pourrait à l'extrême rigueur être atteinte dans l'urine, mais il n'en est pas question dans le sérum.

Ces associations sont donc impuissantes sur de telles souches; c'est pour cela qu'il faut sans cesse découvrir de nouveaux antibiotiques.

TROISIEME PARTIE

DISCUSSION

A l'instar de nombreux auteurs, nous avons effectué les trois associations possibles entre Colistine, Gentamicine et Carbénicilline, sur le bacille Pyocyanique. Les résultats que nous avons obtenus ne peuvent être considérés que d'une façon tout à fait relative, car nous n'avons travaillé que sur deux souches. Nous ne pouvions en effet, à cause du nombre des manipulations nécessitées par la technique des dilutions en carré, en tester un grand nombre dans toutes les conditions où nous nous sommes placés. Nous allons considérer chacune des trois associations dans les 15 expériences que nous avons entreprises.

COLISTINE-GENTAMICINE

1) Nous avons commencé par l'expérience-témoin (n° 1), qui a servi de référence pour toutes les autres, de façon à ce que nous puissions constater si la modification apportée

- dans le milieu,
- ou dans l'inoculum,
- ou dans l'administration des antibiotiques, avait influé sur l'action initialement admise pour cette association.

Pour Colistine-Gentamicine, effectuée sur Mueller-Hinton normal, il est difficile de faire des comparaisons avec ce qu'ont rapporté les auteurs, car ils n'opéraient pas sur ce milieu (c'est également vrai pour les autres associations).

- Néanmoins, DUVAL (43) a rapporté un résultat indifférent, ou au plus additif, tant en bactériostase qu'en bactéricidie, sur 5 souches ;

- BULGER-KIRBY (22) ont obtenu une addition, sur 4 souches testées, en bactéricidie ;

- Par contre, MOUTON-HOLTRIGTER (96) ont signalé l'antagonisme.

Nous serions plutôt de leur avis, car pour notre souche, le résultat a été une indifférence en bactériostase, mais un très net antagonisme en bactéricidie.

Pour notre souche très résistante (expérience n° 15), le résultat n'a pas été le même : en bactériostase, nous avons relevé un antagonisme, mais une synergie en bactéricidie, quoique les doses nécessaires pour obtenir cette synergie soient extrêmement élevées en ce qui concerne la Gentamicine.

Au vu de ces expériences, l'association Colistine-Gentamicine se révèle donc :

1) inutilisable pour notre souche "moyenne", à cause de l'antagonisme observé en bactéricidie ;

2) et inutilisable pour la souche très résistante, à cause des doses trop élevées nécessaires pour que l'on observe la synergie.

2) Le premier paramètre que nous avons ensuite introduit a été le CALCIUM :

C'est GILBERT (57) qui a particulièrement montré les variations dans la sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* à la Gentamicine. Il a notamment travaillé sur Mueller-Hinton, et montré qu'une teneur en Calcium passant de 12 à 105 mg/l faisait monter la CMI de la Gentamicine de 0,57 à 2,1 µg/ml, c'est-à-dire la multipliait par 4.

DAVIS (35) a remarqué que le Calcium inhibait l'action de la Polymyxine sur le Pyocyanique, et que des concentrations physiologiques suffisaient à une inhibition complète de l'antibiotique.

BROWN (17, 18), étudiant le rôle des cations bivalents sur l'action de la Polymyxine B sur *Pseudomonas*, est arrivé aux mêmes conclusions.

Nous avons donc effectué deux séries d'expériences.

a) Nous avons mis, dans l'expérience n° 2, une faible quantité de calcium : la détermination biochimique a donné : 24 mg/l. Nous avons ainsi constaté :

- que la CMI de la Colistine, ainsi que sa CMB, n'étaient pas modifiées : une faible quantité de calcium ne touche donc pas l'activité de la Colistine ;

- que la CMI de la Gentamicine était multipliée par 2, et sa CMB par 4 : la Gentamicine est donc très sensible au calcium : ce qui confirme les affirmations des auteurs.

En ce qui concerne l'association, les courbes, tant en CMI qu'en CMB, ont été peu modifiées : mais, du fait du déplacement des axes de la Gentamicine, la courbe des CMI, d'une indifférence, devient une addition ; et celle des CMB, d'un antagonisme, devient une indifférence.

On peut donc conclure que sur un tel milieu, l'association est meilleure que sur Mueller-Hinton normal.

b) Nous avons mis, dans l'expérience n° 3, une forte quantité de calcium : 153 mg/l.

Dans ce cas, les CMI, CMB des antibiotiques ne se trouvaient plus dans la gamme des concentrations que nous utilisions habituellement.

Pour la Colistine, la CMI était supérieure à 10 µg/ml, et pour la Gentamicine, elle était supérieure à 40 µg/ml : l'association était également illisible : sur ce milieu, il est donc illusoire d'employer cette association. Nous verrons que, sur sérum, nous avons un calcium intermédiaire, et des résultats qui se sont également trouvés intermédiaires.

Il paraît donc souhaitable d'éviter les injections ou perfusions de calcium en même temps que l'on administre ces antibiotiques, si l'on veut éviter leur inactivation.

3) L'influence du POTASSIUM

Nous en avons apporté 10 meq/l, et nous avons constaté :

- la non-modification de la sensibilité à la Colistine;
- l'augmentation de la CMB de la Gentamicine, qui est multipliée par 2.

En association, la courbe des CMI est rigoureusement identique à ce qu'elle était sur le milieu de Mueller-Hinton normal : en bactéricidie, la courbe montre une action meilleure que sur milieu de Mueller-Hinton normal, de sorte qu'un relèvement de l'axe des CMB de la Gentamicine transforme l'antagonisme en indifférence .

Donc, sur un milieu contenant une forte concentration en Potassium (nous comparons cette teneur à la kaliémie de l'homme), l'association ne présente plus le caractère de l'antagonisme, mais celui de l'indifférence : c'est une amélioration, mais elle ne peut cependant pas engager à conseiller son usage pour lutter contre cette souche.

4) L'influence de l'UREE

Ce paramètre non plus n'est pas rapporté dans la littérature : nous avons volontairement mis une très forte concentration en urée (expérience n° 5) : 4,50 g/l.

Nous avons ainsi constaté des modifications dans la sensibilité de notre souche à la Gentamicine : elle paraît plus sensible en bactériostase (1,25 µg/ml) quoique l'on puisse difficilement tenir compte d'une variation d'une dilution, mais beaucoup moins en bactéricidie (40 µg/ml)

La Colistine est aussi active.

L'association, en bactériostase, est meilleure que dans l'expérience témoin ; en bactéricidie, la courbe est très semblable à ce qu'elle était sur milieu de Mueller-Hinton, mais du fait de la moins grande sensibilité du germe à la Gentamicine, l'association a un effet qui est du type indifférence dans ce cas.

L'association Colistine-Gentamicine serait donc indifférente chez les insuffisants rénaux, chez qui les taux d'urémie et de kaliémie sont élevés. Quoiqu'elle ne soit donc pas recommandable, elle ne serait donc pas aussi contre-indiquée que chez un malade non urémique atteint d'une infection due à la même souche, pour lequel les deux antibiotiques seraient antagonistes.

5) L'influence du SERUM

DAVIS (34) a décrit une inactivation de la Colistine par le sérum, dans son action sur le Pyocyanique. Il s'est aperçu que cette inactivation était en fait due au calcium sanguin. Nous avons effectué deux séries d'expériences :

a) sur Sérum Humain (expérience n° 6) : nous avons constaté un abaissement d'une dilution de la CMB de la Colistine (ce qui n'est pas significatif), et une augmentation de 4 pour la Gentamicine. L'association se révélait nettement intéressante, intermédiaire entre une addition et une synergie.

b) sur Sérum de Poulain (expérience n° 7) : de nouveau, nous n'avons pas pu lire les CMB des antibiotiques seuls, et de l'association.

Ces deux expériences sont donc à rapprocher de celles effectuées sur milieu de Mueller-Hinton enrichi de calcium faible , et fort : en effet, le sérum humain avait une calcémie basse, ce qui est confirmé par les CMB des antibiotiques seuls (l'abaissement d'une dilution de la CMB de la Colistine ne peut être considéré comme significatif). Sur sérum humain l'association est donc à rapprocher de ce qu'elle était sur Mueller-Hinton + calcium faible . Sur sérum de poulain, elle est à rapprocher de ce qu'elle était sur Mueller-Hinton + calcium fort.

Dans le cas du sérum humain, nous avons observé , sur ce milieu se rapprochant des conditions d'utilisation in vivo, un effet meilleur qu'in vitro : ce résultat paraît donc encourageant pour une utilisation éventuelle de cette association.

6) L'administration DIFFEREE des antibiotiques

Chaque antibiotique a été tour à tour administré 3 heures, puis 6 heures après le début de l'incubation de l'autre en présence de l'inoculum.

Dans les expériences 8, 9, 10 et 11, nous avons introduit les deux antibiotiques de façon différée, de façon à pouvoir juger si l'on pouvait améliorer l'antagonisme que nous observions dans les conditions d'étude normales.

De ces quatre expériences, on peut conclure que, pour cette souche :

- 1) l'administration différée des deux antibiotiques a un intérêt;
- 2) que le temps séparant l'addition des antibiotiques est plus adapté quand il est de 3 heures que lorsqu'il est de 6 heures ;
- 3) que, dans les deux cas, le meilleur effet est obtenu quand la Colistine est administrée APRES la Gentamicine et que dans l'ordre inverse, l'effet est totalement différent,
- 4) que l'association Colistine-Gentamicine peut être rendue SYNERGIQUE par l'administration :
 - 1° - d'abord de la Gentamicine,
 - 2° - de la Colistine 3 heures après.

7) L'influence de l'INOCULUM

La comparaison entre l'activité de ces deux antibiotiques vis-à-vis du Pyocyanique lorsque l'on fait varier le nombre de germes n'est pas rapportée par les auteurs que nous avons consultés. Nous avons effectué trois expériences.

Des expériences 12 et 13, il ressort que cette association, et pour la souche considérée, paraît plus indiquée pour des germes en très grand nombre, ou en très petit nombre, que pour un inoculum qualifié de moyen, c'est-à-dire comptant environ 500 000 germes/ml.

En effet, en présence de l'inoculum faible, nous avons remarqué que l'action est du type addition, presque synergie, du moins en bactéricidie (en bactériostase, ce serait une indifférence).

Avec l'inoculum lourd, l'association se comporte comme une addition en bactériostase, et se trouve intermédiaire entre une indifférence et une addition en bactéricidie.

Ces résultats, qui sont bien meilleurs que celui que nous trouvions dans l'expérience servant de référence, seraient alors à rapprocher de ceux rapportés habituellement par les auteurs ayant étudié cette association, pour qui l'addition est l'effet le plus souvent rencontré.

Dans l'expérience n° 14, nous avons donc essayé un inoculum se rapprochant de celui qui est universellement utilisé par les auteurs ; nous avons pris une culture âgée de 24 heures.

Nous avons ainsi constaté que les CMI et CMB de la Colistine étaient inchangées ; de même que la CMB de la Gentamicine, dont la CMI était abaissée de moitié.

Nous pouvons donc dire que tous les résultats que nous avons obtenus dans les autres expériences seraient plutôt des résultats par défaut, comparés à ce qu'ils auraient été si nous avions pris un inoculum d'une nuit au lieu de 3 heures. Nous avons cependant employé cette technique, car nous utilisons la Carbénicilline parmi nos antibiotiques : or, ROLINSON (110) a insisté sur le fait qu'il fallait tester ce produit sur des germes jeunes.

Pour cette dernière association, il y a une addition en CMI, et une indifférence en bactéricidie : ce résultat, meilleur que celui de l'expérience témoin, confirme bien ce que nous venons de dire.

L'association Colistine-Gentamicine, sur l'expérience témoin, qui était effectuée en présence d'une culture jeune, s'est donc révélée

- indifférente en bactériostase,
- antagoniste en bactéricidie.

Nous avons pu améliorer son action :

- en présence de potassium et d'urée, de sérum humain : c'est encourageant pour une utilisation pratique ;
- en présence de bactéries peu nombreuses, ou très nombreuses, ou à l'état de repos : c'est également intéressant pratiquement.
- par addition de la Colistine 3 heures après la Gentamicine ; c'est une technique qui mériterait d'être utilisés en thérapeutique.

COLISTINE - CARBENICILLINE

Cette association, comme elle met en jeu la Carbénicilline, a été plus étudiée que la précédente.

- BRUMFITT (21) a rapporté une synergie pour trois souches, en bactériostase et en bactéricidie.
- DUVAL (42) mentionne, au cours de son étude sur cinq souches une indifférence en bactériostase , mais une synergie en bactéricidie .
- CONDON DALTON (32) signale l'antagonisme entre ces deux antibiotiques, en bactériostase .
- De même, que MOUTON (96) , pour qui "la prudence semble indiquée dans la combinaison Colistine-Carbénicilline en usage thérapeutique pour les infections à Pyocyaniques".

1) Dans les expériences tests n° 1 , notre souche s'est révélée intermédiaire cette fois encore ; en CMI, l'association est intermédiaire entre une indifférence et une addition ; et en CMB, l'indifférence est quasi parfaite. Pour la souche très résistante (expérience n° 15), l'association est manifestement antagoniste tant en CMI qu'en CMB, et ne saurait donc être recommandée pour l'éradication de ce germe.

2) L'influence du calcium (expérience n° 2, calcium faible) : les 24 mg/l de calcium n'ont pas changé la sensibilité à la Carbénicilline ;

l'association, en CMI, n'est pas modifiée ; par contre, en CMB, il y a une amélioration, puisque l'on observe presque une addition .

A 153 mg/l, le calcium a également fait monter les CMI et CMB de la Carbénicilline, qui deviennent supérieures aux concentrations maxima usuellement utilisées.

Le calcium modifie donc la sensibilité de notre souche aux trois antibiotiques utilisés.

3) L'influence du potassium

Les 10 meq/l de potassium de l'expérience n° 4 ne modifient pas la sensibilité à la Carbénicilline ; l'association est toujours indifférente en bactériostase, et également en bactéricidie.

Le potassium ne modifie donc pas le caractère de cette association.

4) L'influence de l'urée

Une urée élevée, si elle ne change pas la sensibilité en bactériostase, multiplie quand même par 2 la résistance en bactéricidie en ce qui concerne la Carbénicilline.

En CMI, la courbe visualisant l'effet de l'association, est améliorée et on atteint une addition ;

En CMB, on a un léger antagonisme, pour les fortes concentrations de Colistine jointes aux faibles concentrations de Carbénicilline.

L'association ne serait donc pas intéressante en présence d'une forte urémie.

5) L'influence du sérum

Sur sérum humain (expérience n° 6) comme sur sérum de poulain (expérience n° 7), la CMB de la Carbénicilline n'est pas modifiée. il faut en conclure que l'augmentation de la résistance à la Carbénicilline se produit pour un calcium supérieur à 120 mg/l, ce qui est rassurant pour l'usage clinique.

Sur sérum humain, nous observons une nette amélioration de la courbe des bactéricidies, et l'action devient intermédiaire entre une addition et une indifférence.

Sur sérum de poulain, 200 µg/ml de Carbénicilline seraient utilisables avec 10 et 5 µg/ml de Colistine, mais toutes les autres combinaisons entre les deux antibiotiques ont laissé le germe se développer, de sorte que l'on est obligé de classer cette association comme un antagonisme.

L'utilisation de cette association semble donc limitée par la baisse de la sensibilité à la Colistine.

6) L'administration différée des antibiotiques

Dans l'expérience n° 8, on observe une addition en CMI et en CMB : Le fait de mettre la Colistine 3 heures AVANT la Carbénicilline améliore donc le résultat de l'association.

Dans l'expérience n° 9, où la Colistine est 3 heures après la Carbénicilline, on n'a pas de modification en CMI ; mais en CMB, on a une addition, et presque une synergie . Ces résultats sont meilleurs que ceux de l'expérience précédente.

Les expériences n° 10 et 11, où les antibiotiques sont séparés par un intervalle de 6 heures, sont comparables : dans les deux cas, on voit immédiatement sur le graphique quel est l'antibiotique qui a été mis le premier, puisque les courbes sont parallèles aux axes de cet antibiotique . Cette séparation de 6 heures ne peut être utilisable pratiquement.

En utilisation, on aurait donc intérêt à administrer la Carbénicilline, puis la Colistine 3 heures APRES.

7) L'influence de l'INOCULUM

L'influence de la quantité de germes sur l'action de la Carbénicilline a été largement étudiée. Nous l'avons vu dans le chapitre consacré à l'inoculum.

Et nous l'avons vérifié avec notre souche :

- avec l'inoculum faible de l'expérience n° 12, nous constatons que l'association présente une addition en bactériostase, mais toujours une indifférence en bactéricidie,

- avec l'inoculum lourd de l'expérience n° 13, l'indifférence est retrouvée en bactériostase et en bactéricidie,

- avec l'inoculum âgé de l'expérience n° 14, les CMI et CMB sont restées inchangées, ce qui est surprenant notamment pour une Pénicilline ; pour l'association, la courbe de bactériostase traduit une addition, et celle de bactéricidie une indifférence.

En mettant à part la sensibilité de la Carbénicilline au nombre de bactéries, on peut donc constater que l'association a un effet égal sur un inoculum léger, moyen ou lourd quand il est jeune, et un peu amélioré (en bactériostase) lorsque les germes sont au repos.

L'association Colistine-Carbénicilline ne paraît donc pas utilisable en pratique pour notre souche, car elle n'apporte pas d'amélioration notable à l'action d'un seul des antibiotiques qui entrent dans sa composition.

Il faut remarquer que, au cours des expériences où nous avons fait varier les paramètres (sauf en ce qui concerne l'inoculum, au sujet duquel nous confirmons qu'il faut le fixer soigneusement), la Carbénicilline est restée d'une activité constante sur le Pyocyanique que nous utilisons. Cette stabilité était bien meilleure que celle de la Colistine et que celle de la Gentamicine, ce qui est un facteur de sécurité pour les études de sensibilité in vitro.

L'association, dont l'action principale est du type indifférence, peut être améliorée par l'administration de la Colistine 3 heures après la Carbénicilline.

GENTAMICINE-CARBENICILLINE

Nous reproduisons le tableau publié par FEKETY (51) qui montre l'ampleur des essais entrepris sur les associations où rentre la Carbénicilline.

Antibiotique combiné à la Carbénicilline	Synergie	Indifférence	Antagonisme	Résultat indéterminé	Nombre total de spécimens étudiés
Gentamicine	9	10	0	1	20
Kanamycine	0	16	0	5	21
Polymyxine	3	11	0	9	23
Rifampicine	0	17	0	4	21
Ampicilline	0	10	0	0	10
Pénicilline G	0	9	0	1	10
Méthicilline	0	12	0	0	12
Céphalotine	0	8	0	2	10
Dicloxacilline	0	11	0	0	11
Oxacilline	0	10	0	0	10

On peut voir que, pour cet auteur, sur 20 souches, il y a eu 9 synergies, 10 indifférences , et pas d'antagonisme .

Car à l'exception de McLAUGHLIN (85) qui avait trouvé une inactivation de la Gentamicine par la Carbénicilline, tous les auteurs s'accordent pour reconnaître au moins le caractère de l'addition, et souvent de la synergie , à cette association.

- VACEK (129), qui l'a étudiée sur cinq souches, mettait des doses croissantes de Carbénicilline en présence d'une même dose de Gentamicine, et observait une synergie.

- SMITH (122), travaillant par microtitrage sur bouillon "Beef-Heart infusion" Difco, affirme que la combinaison est synergique sur 5 des 10 souches testées, et qu'elle est plus rapidement et plus complètement bactéricide que n'importe quel antibiotique seul. Il rejoint en cela, l'avis de SONNE-JAWETZ (124) qui, testant 10 souches, admettent une amélioration dans la sensibilité de 8 de ces 10 souches en bactériostase, et pour 5 en bactéricidie (ces auteurs utilisaient un inoculum faible, d'environ 10^4 germes/ml).

- BRUMFITT (21) relève que, pour 3 des 4 souches étudiées, les CMI et CMB des associations Carbénicilline-Gentamicine, Carbénicilline-Colistine, Carbénicilline-Streptomycine sont abaissées de moitié ou du quart.

- RODRIGUEZ (108), étudiant les applications de cette association en thérapeutique, admet qu'elle est efficace dans 56 % des infections traitées, et à 100 % lorsqu'elles sont dues à un Pyocyanique : dans 2 de ces cas, qu'il étudie ensuite *in vitro*, il trouve le même résultat.

- ANDRIOLE (3) observe une synergie pour 16 de ses 50 souches et une synergie partielle pour 30 autres. Il se pose néanmoins la question de savoir si cette association peut vraiment avoir une application clinique, car lorsqu'il administre ces antibiotiques à des rats 6 heures après les avoir inoculés avec le Pyocyanique, les résultats sont moins bons ; pour lui, le délai de 4 heures est celui au bout duquel - soit l'organisme est venu à bout des germes infectants - soit ceux-ci ont gagné des tissus d'où leur éradication sera difficile.

- DUVAL (42), sur 5 souches, présente une synergie pour 3 cas en bactériostase, et pour les 5 en bactéricidie.

PHAIR (103), sur 15 des 16 souches testées, trouve une synergie aussi bien en bactériostase qu'en bactéricidie.

- KLASTERSKY (72), évaluant l'activité de l'association dans les infections à Gram négatif, utilise un inoculum de 10^4 à 10^5 germes/ml

pour ses études in vitro par microtitrage : il trouve en bactériostase, pour 14 souches de *Pseudomonas*, que l'association est synergique pour 11 cas (dont 8 traités cliniquement ont répondu au traitement), additive pour 1 cas, et antagoniste pour 2 (alors qu'il a obtenu une réponse pour l'une d'elles en thérapeutique).

- MOUTON-HOLTRIGTER (96), travaillant sur milieu solide par la technique des bandes imprégnées d'antibiotiques, observent peu de synergies. L'addition est souvent rencontrée, l'indifférence l'est dans 9 cas sur 37 en bactériostase, et dans 23 cas sur 50 en bactéricidie. Ils font remarquer que ces résultats un peu pessimistes sont dûs à un inoculum faible, de l'ordre de 10^5 germes par boîte, alors qu'un inoculum plus fort aurait un effet plus favorable : les résultats en bactériostase seraient les mêmes, s mais en bactéricidie, en observerait plus souvent la synergie.s

1) L'expérience test n° 1

Notre souche, qui s'était montrée de sensibilité moyenne à la Carbénicilline et à la Gentamicine, a montré une certaine sensibilité à leur association. Cependant, si l'addition peut être incontestablement retenue en bactériostase, elle est juste admissible en bactéricidie. Nous n'avons donc pas observé la synergie que nous attendions, mais ce résultat concerne une seule souche.

2) Remarquons que cela est peut-être dû au fait que nous n'utilisons pas un inoculum comparable, qualitativement, à ceux qu'ont employés tous les auteurs cités. C'est pour cela que nous avons effectué les expériences n° 14 avec l'inoculum "âgé" : nous avons ainsi constaté que le Pyocyanique présentait des sensibilités inchangées en bactériostase et en bactéricidie à la Carbénicilline, et que la CMI de la Gentamicine était abaissée de moitié, sa CMB étant inchangée.

En association, nous avons relevé une amélioration nette en bactériostase, puisque nous avons pu admettre presque une synergie ; en bactéricidie, par contre, l'effet global est resté le même, c'est-à-dire une addition.

Il semble donc que cette association n'ait pas son caractère très modifié par l'état de multiplication du germe, à nombre égal de bactéries bien entendu .

3) Avec la souche très résistante (expérience n° 15), la courbe, d'après ce que l'on peut juger, serait celle d'une indifférence en bactériostase, mais plus intéressante en bactéricidie. Cependant, les taux nécessaires sont irréalisables en pratique.

4) Avec le calcium faible (expérience n° 2), la courbe en bactériostase montre une synergie, au lieu de l'addition ; mais en bactéricidie, l'addition n'est plus qu'une indifférence.

La présence de calcium (l'expérience n° 3 en est une confirmation) permettrait donc une meilleure action en bactériostase, mais une moins bonne en bactéricidie. Cette constatation peut rendre gênante une application in vivo.

5) La présence de potassium (expérience n° 4) favorise l'action en bactériostase et en bactéricidie : on observe une belle synergie.

6) L'action de l'association en présence d'urée (expérience n° 5) est intéressante : quoique les fortes concentrations de Gentamicine ne stérilisent pas les tubes où il y a peu de Carbénicilline, en CMI comme en CMB. on doit conclure à une synergie, car la CMB de la Carbénicilline est montée à 400 µg/ml : or , 50 µg de Carbénicilline associés à 0,62 µg de Gentamicine stérilisent la culture, ce qui est un très bon résultat, car ces concentrations sont faciles à atteindre.

L'utilisation de cette association serait donc recommandable chez un urémique qui serait atteint d'une infection due à cette souche puisque les présences de potassium d'une part, d'urée d'autre part ont montré que l'association se révélait nettement plus efficace que l'un quelconque des deux antibiotiques.

7) L'influence du sérum (expérience n° 6) : cette association est celle qui s'est révélée la plus efficace sur sérum de poulain (expérience n° 7) , milieu qui se rapprochait le plus, par sa constitution biochimique, du milieu d'utilisation in vivo. Une dose de 200 µg/ml de Carbénicilline couplée à 0,62 µg/ml de Gentamicine sont des doses utilisables pratiquement.

Sur sérum humain, on peut reconnaître le caractère de l'addition, grâce à la Carbénicilline.

La comparaison de l'influence du sérum sur l'effet des trois associations montre que, sur sérum humain, avec calcium faible, c'est Colistine- Gentamicine qui est la meilleure association : mais sur sérum de poulain, c'est Carbénicilline-Gentamicine. Or sur Mueller-Hinton + 24 mg/l de calcium, ces deux associations étaient comparables : il faut donc conclure que le calcium intervient peut-être sous l'une des deux formes sous lequel il existe normalement dans le sérum, c'est-à-dire sous forme ionisée, ou non ionisée : nous n'avons pas pu préciser davantage le rôle éventuel de cette ionisation.

8) L'administration différée des antibiotiques

a) Gentamicine 3 heures avant Carbénicilline : expérience
n° 8 .

La courbe en bactériostase n'est pas changée, mais en bactéricidie, on observe une indifférence, presque un antagonisme.

b) Gentamicine 3 heures après Carbénicilline : expérience
n° 9 .

Cette fois, on a presque une synergie en bactériostase, et la synergie est manifeste en bactéricidie : on a nettement amélioré l'action observée lors de l'expérience témoin.

c) Gentamicine 6 heures avant Carbénicilline : expérience
n° 10.

Mis à part deux tubes où la concentration en Gentamicine est très faible, la courbe en CMI n'est pas modifiée : en CMB par contre, on observe cette fois une synergie, ce qui est un résultat totalement différent de ce qui était relevé quand les antibiotiques étaient séparés de 3 heures. L'explication est peut-être que, en 6 heures, la Gentamicine n'a laissé subsister que des mutants qui lui sont résistants, mais qui sont sensibles à la Carbénicilline. Lorsque nous ajoutons celle-ci 3 heures seulement après la Gentamicine, il restait encore des bactéries sensibles à la Gentamicine, mais pas à la Carbénicilline, si bien que l'effet observé finalement était différent : l'action globale de l'association serait tributaire de la rapidité d'effet de la Gentamicine.

d) Gentamicine-Carbénicilline avec Gentamicine 6 heures après la Carbénicilline : expérience n° 11 : l'effet est beaucoup moins bon que celui observé avec l'ordre inverse, et les deux courbes diffèrent très peu entre la bactériostase et la bactéricidie.

Avec ces quatre expériences, nous voyons donc la très grande importance du décalage que l'on peut essentiellement effectuer entre l'administration des antibiotiques :

1) Le meilleur résultat est obtenu avec la Gentamicine introduite 3 heures après le début de l'incubation de la Carbénicilline en présence de l'inoculum ;

2) Mais, et c'est là un résultat nouveau par rapport aux autres associations, nous avons également observé une synergie lorsque la Carbénicilline est donnée 6 heures après la Gentamicine : lorsqu'elle l'est 3 heures seulement, le résultat est complètement différent.

9) L'influence de l'inoculum

Les deux antibiotiques étant sensibles au nombre de germes qu'il s'agit de détruire, on pouvait s'attendre à de larges modifications des courbes : nous les avons effectivement observées.

a) L'inoculum léger (expérience n° 12)

On ne peut pas tracer la courbe des CMI : il n'y a aucune culture visible après 24 heures. En CMB, on a une synergie.

b) L'inoculum lourd (expérience n° 13)

En bactériostase, on a une excellente synergie : en bactéricidie, l'action est une addition.

c) L'inoculum âgé (expérience n° 14)

On observe aussi une synergie en CMI, et une addition en CMB.

Cette association semble donc particulièrement indiquée pour des infections où le nombre de germes est réduit, et où ces germes sont en phase de Multiplication. Elle présente la même activité (addition) pour un nombre de germes élevé, ou pour des germes au repos.

ANALYSE DES RESULTATS EN FONCTION DES CONCENTRATIONS SERIQUES

Il faut remarquer que, pour décider de l'opportunité de l'utilisation pratique d'une association, la détermination in vitro du caractère de cette association ne devrait pas suffire à faire prescrire, ou condamner, son emploi : l'important est en effet de voir si l'on peut déterminer un couple de concentrations de ces antibiotiques capable d'abaisser nettement leurs doses : l'effet global d'une association peut en effet être jugé comme étant un antagonisme, mais le tableau visualisant les résultats de l'étude in vitro peut montrer un couple isolé de concentrations qui seront utilisables.

Ainsi dans l'association Colistine-Carbénicilline où la Carbénicilline est introduite 6 heures après la Colistine, on peut avoir une synergie avec 2,5 µg/ml de Colistine et 12,5 µg/ml de Carbénicilline ; mais pour toutes les quantités inférieures de Colistine, on observe un antagonisme.

C'est ce qui explique que, pratiquement, des associations que l'on croit synergiques s'avèrent sans effet in vivo : en effet, si dans l'exemple précédent la quantité de Colistine administrée est finallement inférieure aux 2,5 µg/ml, à la suite des processus de catabolisme, et de non diffusion vers le lieu de l'infection, le germe responsable ne sera pas sensible à cette association.

Et inversement, il y a des associations qui, cliniquement, donnent des résultats meilleurs que ceux que l'on attendait : c'est parce que les concentrations finalement trouvées in situ correspondent à un optimum d'action des antibiotiques.

Le problème, après avoir recherché in vitro si deux antibiotiques sont synergiques, est donc d'évaluer les concentrations à utiliser pratiquement pour détruire les bactéries dans une affection déterminée .

Ainsi, les concentrations qu'il est nécessaire d'obtenir sont :

- . pour la Gentamicine de 3 à 6 $\mu\text{g/ml}$,
- . pour la Colistine de 1 à 3 $\mu\text{g/ml}$,
- . et pour la Carbénicilline de 25 à 50 $\mu\text{g/ml}$.

Ces concentrations sont atteintes dans le sérum couramment ; elles peuvent être très augmentées dans le cas d'infections urinaires. Par contre, ces antibiotiques diffusent très mal dans le liquide céphalo-rachidien et le seul moyen pour y obtenir de telles concentrations consiste à faire l'injection intra-rachidienne.

Une association donnée nécessitant par exemple des concentrations élevées, pour chacun de ses constituants, pour que l'on observe la synergie, ne pourra être utilisée qu'en cas d'infection urinaire ; mais il n'en sera pas question si l'on est en présence d'une endocardite.

Enfin, une association peut apporter une amélioration dans l'emploi de l'un seulement des deux antibiotiques qui rentrent dans sa composition, la présence de l'un d'eux favorisant nettement l'action du second, la réciproque n'étant pas vraie. Exemple : dans l'association Gentamicine-Carbénicilline en présence d'urée, on voit que la CMB de la Carbénicilline est abaissée de 400 à 50 $\mu\text{g/ml}$ par la présence de la Gentamicine, que celle-ci soit à 0,62 ou à 10 $\mu\text{g/ml}$: c'est la Gentamicine qui améliore la sensibilité bactérienne à la Carbénicilline, l'inverse n'étant pas observé.

Il semble donc que la façon "classique" de juger de l'action d'une association, qui avait été exposée par JAWETZ, puisse difficilement rendre compte de ce qui se passera lors de l'utilisation in vivo. Il faudrait en effet introduire des effets "intermédiaires" entre les caractères de synergie, addition, indifférence et antagonisme. Car :

1) les concentrations qui sont finalement trouvées in situ n'ont généralement rien à voir avec celles qui ont été administrées au malade,

2) et le fait d'associer deux antibiotiques ne modifie pas nécessairement la sensibilité des bactéries aux deux produits : les germes peuvent devenir plus sensibles seulement à l'un de ces antibiotiques, grâce à la présence de l'autre.

RESUME

A la suite de nos 15 expériences, nous pouvons donc dire que l'association Gentamicine-Carbénicilline est celle qui paraît présenter la meilleure activité, puisque nous n'avons jamais constaté d'antagonisme entre ces deux antibiotiques. Alors que l'action, en bactéricidie, n'était initialement qu'une addition, nous avons pu l'améliorer et lui conférer le caractère de la synergie à 5 reprises : potassium élevé, urée élevée, séparation de 3 heures, séparation de 6 heures, inoculum léger ; et celui de l'addition s'est maintenu dans trois cas : l'autre séparation de 6 heures, inoculum lourd, inoculum âgé.

La seule ombre sur ces résultats concerne le calcium : il semble que sa présence soit un handicap pour cette association, encore que celle-ci ait été la seule à pouvoir inhiber, avec des doses abordables, des cultures sur un milieu se rapprochant assez bien des conditions d'utilisation in vivo (sur sérum de poulain).

Nous avons regroupé dans ce dernier tableau les résultats de toutes nos expériences :

N°	L'expérience	Coli.- Genta.		Coli. - Carb .		Genta. - Carb.	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
1	Témoins	I	An	I	I	Ad	Ad
2	Calcium faible	I	An	I	I-AD	S	I
3	fort :	illisible					
4	Potassium	I-Ad	I	I	I	S	S
5	Urée	Ad	I	Ad	An	S	S
6	Sérum humain	Ad-S		I-Ad			I
7	poulain	illisible		An			I
8	3 heures	I	An	Ad	Ad	Ad	I
9	-	Ad	S	Ad	Ad-S	S	S
10	6 heures	An	An	I	Ad	Ad	S
11	-	An	Ad	An	Ad	I	Ad
12	Inoculum léger	I	S	Ad	I	Ad-S	S
13	lourd	Ad	Ad	I	I	S	Ad
14	âgé	Ad	I	Ad	I	S	Ad

An : antagonisme

I : indifférence

Ad : addition

S : synergie.

1) L'association Colistine-Gentamicine

Sur les témoins, en CMB, elle est ANTAGONISTE . On peut rendre cette association synergique :

a) avec un petit nombre de germes ;

b) en administrant la COLISTINE 3 HEURES APRES LA GENTAMICINE.

2) L'association Colistine-Carbénicilline

Sur les témoins , elle est INDIFFERENTE. La meilleure amélioration consiste à administrer la COLISTINE 3 HEURES APRES LA CARBENICILLINE.

3) L'association Gentamicine-Carbénicilline

Sur les témoins, ces deux antibiotiques ne présentent qu'une ADDITION en CMB.

L'action devient une Synergie :

- a) en présence de potassium :
- b) en présence d'urée ;
- c) avec un inoculum léger :
- d) et surtout lorsque la GENTAMICINE EST DONNEE 3 HEURES APRES LA CARBENICILLINE, OU 6 HEURES AVANT.

Des résultats aussi variés peuvent donc inciter à la prudence lorsqu'il s'agit de juger de l'opportunité d'une association sur un germe déterminé.

C O N C L U S I O N

La réponse : "Les antibiotiques A et B présentent une synergie, une addition, une indifférence, ou un antagonisme" ne devrait donc pas être donnée sans de minutieuses remarques concernant de multiples facteurs, et nous espérons avoir montré que la modification d'un seul de ces facteurs pouvait troubler le résultat d'une association : il peut donc paraître présomptueux d'affirmer que telle ou telle combinaison apporte une synergie, lorsque l'on imagine la multitude de paramètres existant dans l'organisme humain, qui sont susceptibles de modifier l'observation qui a été faite in vitro. Seule une détermination sérieuse de ceux qui nous sont relativement accessibles pourrait permettre une timide approche. Nous avons essayé dans ce travail de voir le rôle de quelques-uns de ces facteurs.

La composition du milieu d'étude : nous avons vu l'importance du calcium, de l'urée, du potassium ; une teneur élevée en calcium peut compromettre les résultats en élevant les CMI-CMB des antibiotiques ; en présence d'urée et de potassium, en quantités importantes, les associations ont paru avoir une activité meilleure que lorsque ces deux constituants du sérum humain étaient absents du milieu d'étude.

L'inoculum : il est capital, puisque les associations se sont révélées d'un caractère différent, selon le nombre des bactéries effectivement présentes dans le milieu. Cela veut dire qu'une association sera d'une efficacité, in vivo, fonction de la quantité de germes qu'elle devra détruire, ainsi que de leur état de multiplication, rapide ou stationnaire.

A côté de ces résultats, nous insistons sur ceux que nous avons obtenus lorsque l'un des antibiotiques entrant dans l'association était introduit 3 heures, ou 6 heures après que l'autre ait été mis à incuber avec le bacille Pyocyanique.

Il restera cependant à les confirmer sur d'autres souches, puisque nous n'avons effectué nos expériences que sur une seule, étant donné le nombre de manipulations qu'elles ont nécessité. Des essais pourront également être faits sur d'autres espèces microbiennes.

Si ces observations sont vérifiées, un emploi pratique sera alors souhaitable, dans le but d'améliorer le traitement des infections redoutables que l'on rencontre en milieu hospitalier.

B I B L I O G R A P H I E

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - J.F. ACAR .- Les associations de β Lactamines. Synergie in vitro et résultats cliniques.
Patho et Bio., 1971, 19, 593-597.
- 2 - P. ACRED, D.M. BROWN, E.T. KNUDSEN, G.N. ROLINSON, R. SUTHERLAND .- New semi-synthetic Penicillin active against Pseudomonas aeruginosa.
Nature, 1967, 215, 25-30.
- 3 - V.T. ANDRIOLE .- Synergy of Carbenicillin and Gentamicin in experimental infections with Pseudomonas aeruginosa.
The Jal of Infectious Diseases, dec. 1971, vol. 124 sup., 546-555.
- 4 - M. BARBER, P.M. WATERWORTH .- Activity of Gentamicin against Pseudomonas and hospital Sphaphylococci.
The British Medical Jal, 1966, I, 203-205.
- 5 - W.B. BARNES, A.E. BERGER, J.D. ARNOLD .- A scanning electron microscopic study of antibiotic-induced morphological changes of selected micro-organisms.
Federation proceedings, 1971, vol. 30, Nb 2, 679.
- 6 - BEECHAM .- Monographie scientifique, Colloque Pyopen, 16-1-71.
- 7 - S.M. BELL, D.D. SMITH, - Resistance of Pseudomonas aeruginosa to Carbenicillin.
Lancet, 1969, I, 753-754.
- 8 - T. BERGAN, E. BRODWALL, A. OYRI .- Renal excretion of Gentamicin in chronic pyelonephritis.
Acta medica scandinavia, 1971, vol. 189, 1-5.
- 9 - F. BERNHEIM .- Factors which affect the size of organisms and the optical density of suspensions of Pseudomonas aeruginosa and Es. coli.
The Jal of canadian microbiology, 1963, 30, 53-58.
- 10 - J. BLACK, CALESNICK, D. WILLIAMS .- Pharmacology of Gentamicin, a new broad spectrum antibiotic.
Antimicr. agents and Chemoth., 1963, 138-147.
- 11 - J. BLACK, GIRDWOOD .- Carbenicillin resistance in Pseudomonas aeruginosa.
The British Medical Jal, 1969, 4, 234.
- 12 - G.P. BODEY, V. RODRIGUEZ, J.K. LUCE .- Carbenicillin therapy of Gram negative infections.
The American Jal of Med. Sc., 1969, 257, 408-414.
- 13 - G. BODEY, V. RODRIGUEZ, S. STEWART .- Clinical, pharmacological studies of Carbenicillin.
The American Jal of Med. Sc. March 1969, 257, 185-190.

- 14 - G. BODEY , L.M. TERELL .- Activity of Carbenicillin against gram negative bacilli .
The Jal of Bacteriology , 1968, 95, 1587-90.
- 15 - G. BODEY, J.P. WHITECAR, E. MIDDLEMAN, V. RODRIGUEZ .- Carbenicillin therapy for *Pseudomonas aeruginosa*.
The Jal of Amer. medical assoc. , 1971, oct. 4, 62-66.
- 16 - J.BRISOU, DENIS. Comportement des *Serratia* d'origine hospitalière en présence de quelques associations d'antibiotiques.
Patho. et Bio. , 1971, vol. 19, n° 11-12, 655-660.
- 17 - M.R. BROWN, J. MELLING .- Role of divalent cations in the action of Polymyxin B and EDTA on *Pseudomonas aeruginosa*.
Jal of general microbiology, 1969, 59, 263-274.
- 18 - M.R. BROWN, W. WATKINS .- LOW magnesium and phospholipid content of cellwalls of *Pseudomonas aeruginosa* resistant to Polymyxin.
Nature, 1970, 227, 1360-1361.
- 19 - M.R. BROWN, B.E. WINSLEY .- Synergism between Polymyxin and Polysorbate 80 against *Pseudomonas aeruginosa*.
Jal of general microbiology, nov. 1971, vol. 68, part 3, 367.
- 20 - M.R. BROWN, B.E. WINSLEY .- Effect of Polysorbate 80 on cell-leakage and viability of *Pseudomonas aeruginosa* exposed to rapid changes of pH, temperature and tonicity. Jal of general microbiology, 1969, 56, 99.
- 21 - W. BRUMFITT, A. PERCIVAL, D.A. LEIGH .- Clinical and laboratory studies with Carbenicillin.
Lancet, 1967, I, 1289-1293.
- 22 - R. J. BULGER, W.M.M. KIRBY .- Gentamicin and Ampicillin : synergism with others antibiotics.
The American Jal of Med. Sc., 1963, 246, 717-726.
- 23 - BULGER-NIELSON .-In vitro evaluation of the Hetacillin/Dicloxacillin antibiotic combination.
The American Jal of Med. Sc. , 1968, 155-165.
- 24 - D.H. CALHOUN, R.A. JENSSEN .- Significance of altered carbon flow in aromatic amino-acids synthesis : an approach to the isolation of regular mutants in *Pseudomonas aeruginosa*.
Jal of bacteriology, jan. 1972, vol. I, 365-372.
- 25 - Y. A. CHABBERT .- Une technique nouvelle d'étude de l'action bactéricide des associations d'antibiotiques : le transfert sur cellophane.
Annales Institut Pasteur, 1957, 93, 289-299.
- 26 - Y.A. CHABBERT .- Problèmes posés par l'étude des sensibilités et des résistances des *Pseudomonas aeruginosa* à la Carbénicilline.
Monographie scientifique Beecham, Paris, 16-1-71, 60-69 .
- 27 - E.D. CHISOLM , J.S. CALNAN, P.M. WATERWORTH .- Distribution of Gentamicin in body fluids.
The British medical Jal, 1968, 2, 22-24.

- 28 - D. CHRISTOL, A. BURE, Y. BOUSSOUGANT, J. WITCHITZ .- Evolution de la résistance à la Gentamicine.
La Presse médicale, 1971, 79, n° 11, 467-470.
- 29 - J.H. CHRISTY .- Treatment of gram-negative shock.
The American Jal of medicine, jan. 1971, 50, 77-88.
- 30 - R. CLUZEL, R. VAUBS, M. CLUZEL-NIGAY, J. MICHEL .- Bactéricidie d'antibiotiques associés vis-à-vis d'entérobactériacées et pseudomonadacées.
Patho. et Bio., 1964, vol. 12, n° 1-2, 47-51.
- 31 - C.E. COX .- Gentamicin : a new aminoglycoside antibiotic ; clinical and laboratory studies in urinary-tract infections.
The Jal of infectious diseases, 1969, 119, 486-491.
- 32 - A. CONDON-DALTON, M.E. PLAUT .- Susceptibility of Pseudomonas aeruginosa to Colistin combined with Carbenicillin or Sulfamethoxazole.
The American Jal of the medical Sc., june 1971, 261, 335-340.
- 33 - J.H. DARREL, P.M. WATERWORTH .- Carbenicillin resistance in Pseudomonas aeruginosa from clinical material.
The British medical Jal, 1969, 3, 141-143.
- 34 - S. DAVIS, A. IANETTA, R. WEDGWOOD .- Paradoxical synergism and antagonism between serum and the antibacterial activity of Colistine.
The Jal of infectious diseases, 1971, n° 4, 123, 392-398.
- 35 - S. DAVIS, A. IANETTA, R. WEDGWOOD .- Antibiotics for Pseudomonas aeruginosa : sepsis inadequate proof of efficacy.
The Jal of infectious diseases, 1971, 124, n° 1, 104.
- 36 - S.J. DECOURCY, M. BARR, W. BLACKMORE, S. MUDD .- Prevention of antibiotic resistance in vitro with St. aureus, Esc. coli, Ps. aeruginosa by Coumadine.
The Jal of infect. disease, 1971, 123, n° I, II.
- 37 - S.J. DECOURCY, S. MUDD .- Effect of the nutritionnal environment on the development of resistance to Polymyxine B, in Pseudomonas aeruginosa and its prevention by Atebrine.
Antimicr. Agents and Chemoth., 1968, 72-77.
- 38 - C.H. DEMOS, N.J. CLIFTON .- Carbenicilline and bleeding.
J.A.M.A., nov. 1, 1971, 739.
- 39 - F. DENIS, M. GESLIN, Y. BOILLEAU .- Influence du chlorure de sodium sur l'activité antimicrobienne de la Gentamicine .
Compte-rendu des séances de la Société de biologie , 1970, 164, n° 10, 1093.
- 40 - H. DOWLING .- Present status of therapy with combinations of antibiotics.
The American Jal of medicine, 1965, 39, 796.
- 41 - H. DOWLING.- An overview of the use of combinations of antibiotics.
Antimicr. Agents and Chemoth., 1967, 234-235.
- 42 - J. DUVAL .- Y a -t-il des bases in vitro à l'utilisation de la Carbénicilline en association ?
Monographie scientifique Beecham, Paris 16-1-71, 70-85.

- 43 - J. DUVAL, C. SOUSSY, P. MATHIEU St LAURENT .- Associations d'antibiotiques actives sur *Pseudomonas aeruginosa*.
Patho et Bio. , 1971, 19, 637-648.
- 44 - EAGON, SIMMONS, CARSON .- Evidence for the presence of ash and divalent metals in the cell-wall of *Pseudomonas aeruginosa*.
The Canadian Jal of Microbiology, 1965, II, 1041-1042.
- 45 - J.EASTWOOD, J.R. CURTIS .- Carbenicillin administration in patients with severe renal failure.
The British medical Jal, 1968, I, 486.
- 46 - T.C. EICKHOFF .- In vitro effects of Carbenicillin combined with Gentamicin or Polymyxin B against *Pseudomonas aeruginosa*.
Applied microbiology, 1969, 18, 469-473.
- 47 - T.C. EICKHOFF, M. FINLAND .- Polymyxin B and Colistin : in vitro activity against *Pseudomonas aeruginosa*.
The American Jal of med. Sc., 1965, 249, 172-174.
- 48 - ELEK, HILSON, DEWELL .- Aspects of combined antibiotic treatment.
The British medical Jal, 1953, 1298-1300.
- 49 - A.R. ENGLISH .- Laboratory studies with Carbenicillin.
Antimicr. Agents and Chemoth., 1968, 482-488.
- 50 - F.G. FALCO, H.M. SMITH, G.M. ARCIERI .- Nephrotoxicity of aminoglycosides and Gentamicine.
The Jal of infect. diseases, 1969, 119, 406-409.
- 51 - R. FEKETY, O. COE, B.J. BRUCE, P.W. PARTAIN .- Observations sur l'activité de la Carbénicilline.
Compte-rendu Symposium, New-York, 12-7-69, Excerpta medica Foundation, Amsterdam, Juil. 70, 138-143.
- 52 - R. FEKETY, P. WEISS .- Enhanced susceptibility of Enterococci to combinations of Streptomycine and Penicillin.
Antimicr. Agents and Chemoth. , 1966, 156-163.
- 53 - M. FINLAND .- The symposium on Gentamicin.
The Jal of inf. diseases, 1969, 119, 537-540.
- 54 - A.M. FISHER .- A method for determination of antibacterial potency of serum during therapy of acute infections.
Bull. of John Hopkin's hospital, 1952, 90, 313-320.
- 55 - M.A. FRAHER, E. JAWETZ .- Combined action of β lactamase resistant penicillins and β lactamase susceptible Penicillins on 20 strains of *Pseudomonas aeruginosa*.
Antimicr. Agents and Chemoth., 1970, 405-409.
- 56 - GARROD, WATERWORTH .- Effect of medium composition on the apparent sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* to Gentamicin .
Jal of clinical pathology, 1969, 22, 534-8.
- 57 - D.N. GILBERT, E. KUTSCHER, P. IRELAND , J. BARNETT, J. SANFORD .- Effect of the concentrations of magnesium and calcium on the in vitro susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to Gentamicin.
The Jal of inf. diseases, 1971, 124 sup., 537-545.

- 58 - C. GINGELL, T.M. WATERWORTH .- Dose of Gentamicin in patients with normal renal function and renal impairment.
British medical Jal, 1968, 2, 19-22.
- 59 - GRAY, WILKINSON .- The action of EDTA on Pseudomonas aeruginosa.
Jal of applied bacteriology, 1965, 28 (1), 153-164.
- 60 - F.E. HAHN, S.G. SARRE .- Mechanism of action of Gentamicin.
Jal of inf. diseases, 1969, 119, 364-369.
- 61 - W.E. HERRELL, A. BABOWS, J. BECKER .- Bactericidal effect of the combination of Cephalotin and Streptomycine against viridans-group Steptococci.
Antimicr. agents and Chemoth., 1964, 350-354.
- 62 - W. HEWITT, B. SILIGMAN, R. BLIGH .- Kinetics of synergism of Peni-Strepto. and Peni-Kana. for enterococci and L forms.
The Jal of laboratory and clin. medicine, 1966, 67, n° 5, 792-807.
- 63 - HERWICK, WEISS, FEKETY .- Application of microtitration techniques to bacteriostatic and bactericidal antibiotic susceptibility testing.
The Jal of Lab. and Clin. Med., 1968, 72, 511.
- 64 - J.L. HIRSCHMAN, E.T. HERFINDAL .- Urinary tract infection.
The Jal of American Pharmaceutical association, nov. 1971, vol. NS II, n° 11, 619-623.
- 65 - T.A. HOFFMANN, W.E. BULLOCK .- Carbenicillin therapy of Pseudomonas and other gram-negative bacillary infections.
Annals of internal medicine, 1970, 73, 165-171.
- 66 - T.A. HOFFMANN, R. CESTERO, W.E. BULLOCK .- Pharmacodynamics of Carbenicillin in hepatic and renal failure.
Ann. of Int. med. , 1970, 73, 173-178.
- 67 - K.HOLMES, CLARK, SILVERBLATT, TURCK .- Emergence of resistance in Pseudomonas during Carbenicillin therapy.
Antimicr. Agents and Chemoth., 1969, 391-397.
- 68 - E. JAWETZ .- Combined antibiotic action ; some definitions and correlations between laboratory and clinical results.
Antimicr. Agents and Chemoth., 1967, 203-209.
- 69 - E. JAWETZ, J.B. GUNNISON .- Antibiotic synergism and antagonism: an assessment of the problem.
The pharmacological review, 1953, 5, 175-192.
- 70 - R.J. JONES, E.J.L. LOWBURY .- Prophylaxis and therapy for Pseudomonas infections with Carbenicillin and Gentamicin.
The Brit. Med. Jal, 1967, 3, 79-82.
- 71 - M.C. JORDAN, H.C. STANDIFORD, W.M.M. KIRBY .- Carbenicillin in treatment of severe infections due to Pseudomonas aeruginosa .
Jal of inf. diseases, 1970, 122, S 96-103.

- 72 - KLASTERSKY, CAPPEL, DOBUSSHER .- Evaluation of Gentamicin with Carbenicillin in infections due to gram-negative bacilli.
The current therapeutic research, march 1971, vol. 13, n° 3, 174-181.
- 73 - J.D. KLEIN, T.C. EICKHOFF, M. FINLAND .- Gentamicin : activity in vitro and observations in twenty-six patients.
Amer. Jal of Med. Sc., 1964, 249, 528-544.
- 74 - E.T. KNUDSEN, G.N. ROLINSON, R. SUTHERLAND.- Carbenicillin : a new semi-synthetic Penicillin active against Pseudomonas pyocyanea.
The Brit. Med. Jal, 1967; 3, 75-78.
- 75 - P. de LAJUDIE .- Courbes d'essai bactériostatique des associations tétracyclines-macrolides.
Patho. et Bio., 1971, 19, 607-612.
- 76 - D.B. LOURIA, L. YOUNG, D. ARMSTRONG .- Gentamicin in the treatment of pulmonary infections.
Jal of Inf. diseases, 1969, 119, 483-485.
- 77 - E.J. LOWBURY, A. KIDSON, H.A. LILLY, G. AYLIFE, R. JONES .- Sensitivity of Pseudomonas aeruginosa to antibiotics : emergence of strains highly resistant to Carbenicillin. Brit.Med. Jal.,1969,3,79-82
- 78 - LOWBURY, MARSH .- Semi-automatic microtechnique for serial dilutions antibiotic sensitivity testing.
The Jal of lab. and clin. med., 1968, 72, n° 4, 685-687.
- 79 - A. LURIE .- Carbenicillin-induced coagulopathy.
Lancet, 1970, I, 1114-1115.
- 80 - V.E. McBRYDE, H.T. DOWLING, M. MELLODY .- Comparison of tube and plate methods for testing combinations of antibiotics against Hemophilus influenzae.
Antimicr. Ag. and Chemoth., 1966, 267-273.
- 81 - W.R. McCABE .- Clinical use of combinations of antimicrobial agents.
Antimicr. Ag. and Chemoth., 1967, 225-233.
- 82 - McCABE, JACKSON .- Gram negative bacteriemia : clinical, laboratory and therapeutic observations.
Arch. of Int. Med., 1962, 110, 856-864.
- 83 - G.H. McCracken , L.G. JONES .- Gentamicin in the neonatal period.
American Jal of Dis. of children, 1970, 120, 524-536.
- 84 - M.C. McHENRY, T.L. GAVAN, R.W. GIFFORD, N.A. GEMKINK, R.A. VANOMMEN, M.A. TOWN, J.G. WAGNER .- Gentamicin, dosage for renal insufficiency : adjustments based on endogenous creatinine clearance and serum creatinine concentration.
Ann. of Int. Med., feb. 1971, 192-197.
- 85 - J.E. McLAUGHLIN, D.S. REEVES, M.R.C. PATH.- Clinical and laboratory evidence for inactivation of Gentamicin by Carbenicillin .
Lancet, 1971, feb. 6, 261-264.

- 86 - MANTEN, WISE .- Antagonism between antibacterial drugs.
Nature, 1961, 192, 671-672.
- 87 - J.H. MARIMONT, R.M. WENTZ .- Serial dilution of antibiotic sensitivity testing with the microtiterator system.
The amer. Jal of clin. Pathology, 1966, 45, 548-551.
- 88 - M.I. MARKS, T.C. EICKHOFF.- Carbenicillin : a clinical and laboratory evaluation.
Ann. of Int. Med., 1970, 73, 179-187.
- 89 - C.M. MARTIN, A.J. CUOMO, M.J. GERAGHTY .- Gentamicin sulfate in the treatment of extra-urinary infections due to gram negative bacteria. The Jal of Inf. diseases, 1967, 119, 506-517.
- 90 - A.W. MATHIES, J.M. LEEDORM, D. IVLER, P. WERLE, B. PORTNOY .- Antibiotic antagonism in bacterial meningitidis.
Antimicr. Ag. and Chemoth., 1967, 218-224.
- 91 - A. MEDEIROS, T. O'BRIEN, W. WACKER, N. YALUG .- Effect of salt concentration on the apparent in vitro susceptibility of Pseudomonas aeruginosa and other gram negative bacilli to Gentamicin.
The Jal of inf. diseases, dec. 1971, vol. 124, suppl. 559-564.
- 92 - M. MILLER, R. PERKINS.- Effect of pH on Carbenicillin activity in vitro against Proteus mirabilis. Jal.of Lab. Clin. Med., 1971, 78, 5, 984.
- 93 - R. MOELLERING, A. WEINBERG .- Effect of various antibiotics on the uptake of carbon labeled Streptomycin by enterococci.
The Jal of Clinical investigation, dec. 1971, vol. 50, n° 12, 2580-2584.
- 94 - R. MOELLERING, C. WENNERSTEN, A. WEINBERG .- Studies on antibiotic synergism against enterococci.
The Jal of Lab. and Clin. med., may 1971, 77, n° 5, 821-828.
- 95 - M.R. MOODY, V.M. YOUNG, D.M. KENTON, G.D. VERMEULEN .- Pseudomonas aeruginosa in a center for cancer research : distribution of intraspecial types from human and environmental sources.
The Jal of Inf. diseases, feb. 1972, 125, n° 2, 95-101.
- 96 - R.P. MOUTON, B. HOLTRIGTER .- Carbenicillin and Gentamicin in antibiotic combinations in vitro.
Chemotherapy, 1969, 14, 371-383.
- 97 - H.C. NEU, H.C. SWARTZ .- Carbenicillin : clinical, and laboratory experience with a parenterally administration of Penicillin for treatment of Pseudomonas infection. Ann. of Int. Med., 1970, 73, 173-178.
- 98 - NEWSON, SYKES, RICHMOND .- Detection of a β lactamase active against Carbenicillin in a strain of Pseudomonas aeruginosa.
The Jal of Bacteriology, mar. 1970, 101, 1079-1080.
- 99 - B.A. NEWTON.- Mechanisms of antibiotic action.
Ann. Review of Microb , 1965, 19, 209-240.

- 100 - E. OSWALD, R.J. REEDY, W. WRIGHT .- In vitro antistaphylococcal effects of Erythromycin combined with semisynthetic Penicillins. Antimicrob. Ag. and Chemoth., 1964, 406-409.
- 101 - J.C. PATTE, H. HIRSCH, Y.A. CHABBERT .- Etude des courbes d'effet bactériostatique des associations d'antibiotiques. Ann. de l'Inst. Past. , 1958, 94, 621-635.
- 102 - J.C. PECHERE .- Les synergies de l'association Trimethoprime-Sulfamethoxazole. Pathol. et Bio., 1971, 19, 621-626.
- 103 - J. PHAIR, C. WATANAKUNAKORN , T. BANNISTER .- In vitro susceptibility of Pseudomonas aeruginosa to Carbenicillin and the combination of Carbenicillin with Gentamicin. Applied Microbiology, 1969, 303 -306.
- 104 - A. PINES, H. RAFAAT, G.M. SIDDIQUI, J.S.B. GREENFIELD .- Treatment of severe Pseudomonas infections of the bronchi. The Brit. Med. J., 1970, I, 77-88.
- 105 - R.S. PRESSMAN, M. GECZY, V. MERANAO .- Successful treatment of bacterial endocarditis due to Pseudomonas aeruginosa. The Amer. J. of Cardiology, 1966, 17, 97-100.
- 106 - L. RIFF, G.G. JACKSON .- Gentamicin plus Carbenicillin. Lancet, 1971, I, 592.
- 107 - C. ROBINSON .- Human pharmacology of Carbenicillin, a semisynthetic penicillin active against Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Ag. and Chemoth., 1967, 614-618.
- 108 - V. RODRIGUEZ, J. WHITECAR, G. BODEY .- Therapy of infections with the combination of Carbenicillin and Gentamicin . Antimicrob. Ag. and Chemoth., 1969, 386-390.
- 109 - E. ROE, R.J. JONES, E.J. LOWBURY .- Transfert of antibiotic resistance between Pseudomonas aeruginosa, Esc. coli, and other gram negative bacilli in burns. Lancet, 1971, I, 149-152.
- 110 - G.N. ROLINSON .- Bactériologie de la Carbénicilline. Monogr. scient. Beecham, Paris, 16-1-71, 12-25.
- 111 - A.J. ROSENBERG .- Correct serum level of antibiotics. J.A.M.A. , feb. 1971, 215, 796-797.
- 112 - L.D. SABATH .- Synergy of antibacterial substances by apparently known mechanisms. Antimicrob. Ag. and Chemoth. , 1967, 210-217.
- 113 - L.D. SABATH, E. ABRAHAM .- Synergistic action of Penicillins and Cephalosporins against Pseudomonas pyocyanea. Nature, 1964, dec. 12, 1065-1069.

- 114 - L.D. SABATH, J. CASEY, P. RUCH, L. STUMPF, M. FINLAND .- A rapid micro-assay of Gentamicin, Kanamycin, Neomycin, Streptomycin, Vancomycin, in serum or plasma.
Jal of Lab. and Clin. med., sept. 1971, 457.
- 115 - L.D. SABATH, H. ELDER, C. McCALL, M. FINLAND .- Synergistic combinations of Penicillins in the treatment of bacteriuria.
New England Jal of Med. , 1967, 277, 5, 232-238.
- 116 - L.D. SABATH, D. GERNSTEIN, M. FINLAND .- Enhanced activity of Novobiocin against gram negative bacilli in acid media.
Antimicro. Ag. and Chemoth., 1968, 398-404.
- 117 - L.D. SABATH, C.E. McCALL, N.H. STEIGBIGEL , M. FINLAND .- Synergistic Penicillin combinations for treatment of urinary tract infections.
Antimicro. Ag. and Chemoth., 1967, 149-155.
- 118 - R.L. SHIRLEY, J.W. MOORE .- Pseudomonas aeruginosa urinary tract infections.
New England Jal of med., 1965, 273-283.
- 119 - F. SILVERBLATT, M. TURCK .- Laboratory and clinical evaluation of Carbenicillin.
Antimicro. Ag. and Chemoth., 1968, 279-285.
- 120 - N.A. SIMMONS, M.C. PATH .- Potentiation of inhibiting activity of Colistin on Pseudomonas aeruginosa by Sulphamethoxazole and sulphamethizole.
The Brit. Med. Jal, 1969, 3, 693-696.
- 121 - C.B. SMITH, P.E. DANS, J.N. WILFERT, M. FINLAND .- Use of Gentamicin with other antibiotics.
The Jal of Inf. diseases, 1969, 119, 370-377.
- 122 - C.B. SMITH, J.N. WILFERT, P.E. DANS, T. KURRUS, M. FINLAND .- In vitro activity of Carbenicillin, singly and with Gentamicin.
The Jal of inf. diseases, sept. 1970, 122 suppl., S 14-25.
- 123 - C.F.T. SNELLING, A.R. RONALD, D.A. KERNAHAN, W.R. WATERS, L. VISTNES.- Topical Gentamicin in burns.
Antimicro. Ag. and Chemoth., 1969, 380-385.
- 124 - M. SONNE, E. JAWETZ .- Combined action of Carbenicillin and Gentamicin on Pseudomonas aeruginosa in vitro.
Applied Microbiology, june 1969, 17, 893-897.
- 125 - H.C. STANDIFORD, M.C. KIND, W.M. KIRBY .- Laboratory and clinical studies of Carbenicillin against gram negative bacilli.
Antimicro. Ag. and Chemoth., 1968, 286-291.
- 126 - STEPHENSON, STRATFORD .- Results of Pseudomonas aeruginosa.
Lancet, 1969, I, 1098.
- 127 - SYMPOSIUM .- Symposium on Carbenicillin : a clinical profile.
The Jal of Inf. diseases, 1970, vol. 122.

- 128 - W.H. TRAUB, J.C. SHERRIS .- Studies on the interaction between serum bactericidal activity and antibiotics in vitro. Chemotherapy, 1970, 15, 70-83.
- 129 - V. VACEK, M. WAGNEROVA .- On the problem of efficient antibiotic therapy of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Chemoth., 1969, 14, 308-321.
- 130 - M. VERON .- Pouvoir pathogène actuel des *Pseudomonas*. Monogr. scient. Beecham, Paris, 16-1-71, 56-59.
- 131 - J.A. WAITZ, M.J. WEINSTEIN .- Recent microbiological studies with Gentamicin. Jal of Inf. diseases, 1969, 119, 335-360.
- 132 - WATANAKUNAKORN , HAMBURGER .- Induction of Spheroblasts of *Pseudomonas aeruginosa* by Carbenicillin. Appl. Microb., 1969, 171, 935-937.
- 133 - J.H. WEINSTEIN, G. LUEDEMANN, E.M. ODEN .- Gentamicin, a new broad spectrum antibiotic complex. Antimicr. Ag. and Chemoth., 1963, 1-13.
- 134 - M. WELSH .- Introduction Patho. et Bio., 1971, 19, 580-583.
- 135 - A. WHELTON, G. CARTER .- Carbenicillin-induced acidosis and seizures. J.A.M.A., dec. 1971, 218, 1942-1943.
- 136 - T.W. WILLIAMS, N.W. GLASGOW .- In vitro activity of Carbenicillin against gram negative bacilli. Antim. Ag. and Chemoth., 1968, 388-391.
- 137 - R.E. WINTRES, A.W. CHOW, R.H. HECHT, W.L. HEWITT .- Combined use of Gentamicin and Carbenicillin. Ann. of Int. Med., dec. 1971, 925-927.
- 138 - R. WOERLE .- Les associations d'antibiotiques. Lyon médical, dec. 1971, 135-136.
- 139 - P. ZECH, J. TRAEGER, J. FLEURETTE .- L'action bactéricide de l'association Peniciline-Colimycine. Etude sur 31 souches de PYOCYANIQUES. Lyon Médical, 1969, 221, 813-815.

TABLE DES MATIERES

PREMIERE PARTIE

	Pages
I - Introduction	1
II - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : morphologie, caractères culturels, caractères métaboliques, constitution antigénique, résistances aux conditions physico-chimiques, pouvoir pathogène, sensibilité aux antibiotiques	2
III - Intérêt général des associations d'antibiotiques	7
1) Pourquoi associer des antibiotiques	7
2) Comment évaluer la valeur d'une association	8
3) Intérêt des associations sur les espèces bactériennes	10
4) L'intérêt des associations sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : le cas des associations entre Colistine, Gentamicine et Carbénicilline	12
IV - La détermination pratique de la valeur d'une association sur un germe donné	16
A - Les tests in vivo	16
B - Les tests in vitro	17
1) Choix des antibiotiques à tester	17
2) Les techniques	18
a) Dilutions en carré en milieu liquide	18
b) Microtitrage	18
c) Imprégnation de disques	18
d) Diffusion en milieu gélosé	19
e) Dilutions en milieu gélosé	19
f) Comparaison des méthodes	19
3) Importance de certains paramètres du milieu d'étude in vitro	20
a) Quelques milieux utilisés	20
b) Le pH	20
c) Les ions Ca et Mg	20
d) Le chlorure de sodium	21

e) Le sérum	22
f) L'inoculum	23
1) Numération	23
2) Age	25
g) La température d'incubation	26
h) L'administration des antibiotiques	26
i) Le moment de la détermination des CMI et CMB et de l'effet des associations	27
4) La lecture de l'association et l'interprétation	28
 V - Les antibiotiques utilisés	 30
1) La Colistine	30
2) La Gentamicine	31
3) La Carbénicilline	32
 VI - Conclusion	 36

DEUXIEME PARTIE

I - Matériel et méthodes	38
1) Description de la méthode des dilutions en carré utilisée	38
2) Les souches bactériennes	39
3) Le milieu d'étude	39
4) Les antibiotiques	40
5) Le protocole opératoire	42
6) Lecture et interprétation des résultats	43
 II - Variations expérimentales des différents paramètres	 43
1) Modifications chimiques du milieu	43
2) Les deux antibiotiques introduits à des temps différents	44
3) L'inoculum	44
4) L'utilisation d'une souche très résistante	44
5) Le schéma de l'expérimentation	45

III - Résultats personnels	45
1) Le protocole standard	45
- Détermination des CMI-CMB de chaque antibiotique	45
- L'effet des associations entre les trois antibiotiques	48
2) La variation de divers paramètres	51
1 - Modifications dans la nature chimique du milieu	51
A - Le calcium	51
a) A faible concentration	51
b) A forte concentration	52
B - Le potassium	55
C - L'urée	58
D - Le sérum humain	62
E - Le sérum de poulain	65
2 - Les deux antibiotiques sont administrés à des temps <u>différents</u>	68
A - Séparation de trois heures	68
B - Séparation de six heures	74
3 - L'influence de l'inoculum	80
A - L'importance de l'inoculum	80
1) Inoculum très faible	80
2) Inoculum lourd	82
B - L'âge de l'inoculum	84
3) Une souche très résistante	87
 <u>TROISIEME PARTIE - DISCUSSION</u>	 90
I - L'association Colistine-Gentamicine	90
II - L'association Colistine-Carbénicilline	97
III - L'association Gentamicine-Carbénicilline	101
IV - Analyse des résultats en fonction des concentrations sériques	107
V - Résumé	109
CONCLUSION	112
BIBLIOGRAPHIE	114

CONCLUSIONS

Le but de notre travail était de rechercher les modalités d'activités bactériostatique et bactéricide des associations binaires de trois antibiotiques actifs sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Après avoir déterminé le caractère de ces associations (entre Colistine, Gentamicine et Carbénicilline) par la technique des dilutions en carré, nous avons recherché les modifications entraînées par les variations de certains paramètres.

Nous avons ainsi apporté des modifications aux conditions habituelles d'étude in vitro :

- 1) en ajoutant à ce milieu des composants chimiques qu'il ne contient pas normalement, et qui interviennent souvent en thérapeutique : calcium, urée, potassium ;
- 2) en utilisant pour milieu du sérum (d'homme ou de poulain) ;
- 3) en étudiant le germe pris dans des conditions variables (quantité et état de multiplication) ;
- 4) et en faisant agir les antibiotiques selon différentes modalités (simultanément ou successivement, dans des ordres différents).

Nous avons ainsi pu déterminer des améliorations dans l'action sur notre souche pour les associations suivantes :

1) Colistine-Gentamicine : ces antibiotiques, dont l'association déterminée dans les conditions classiques produisait un antagonisme, ont été rendus synergiques : en présence d'un petit nombre de bactéries, ou par administration de la Colistine trois heures après la Gentamicine.

2) Colistine-Carbénicilline : leur association classique était l'indifférence. La meilleure amélioration a consisté à administrer la Colistine trois heures après la Carbénicilline.

3) Gentamicine-Carbénicilline : l'association de ces antibiotiques produisait une addition. Nous avons pu obtenir une synergie d'action en présence de potassium ; d'urée ; d'un inoculum léger ; et surtout lorsque la Gentamicine était introduite trois heures après la Carbénicilline, ou six heures avant.

Le Président de la Thèse :

VU et permis d'imprimer
LYON, le

VU, le Doyen :



Le Recteur, Président du
Conseil de l'Université,

CONCLUSIONS

Nous avons enfin constaté qu'aucune de ces trois associations ne parvenait à détruire une souche particulièrement résistante, en raison des doses très élevées qui ne pouvaient être atteintes pratiquement.

Les différences que nous avons obtenues dans le résultat des associations lorsque nous avons fait varier les conditions d'expérimentation montrent avec quelle prudence on doit préconiser l'emploi d'une association en thérapeutique : la prise en considération chez le malade des différents paramètres examinés peut orienter vers l'emploi d'une association, alors qu'une autre, sur le même germe, sera préférable chez un autre malade dont les données biologiques sont différentes.

Le Président de la Thèse :

VU et permis d'imprimer

LYON, le 8 juin 1972

~~Le Recteur~~ Président du
Conseil de l'Université, Claude Bernard

J. BOIDIN

VU, le 8 juin 1972, le Directeur de l'U.E.R.
des Sciences Pharmaceutiques
Pour le Directeur,
Le Directeur Adjoint,

LODDOUX

